FACULTE DE MEDECINE DE DIJON

Année 1981 - N° 140

# EFFET TROPHIQUE IN VITRO DES HORMONES GASTROINTESTINALES SUR DES LIGNEES DE CELLULES CANCEREUSES GASTRIQUES ET COLIQUES ETABLIES CHEZ LE RAT

**T H E S E**

présentée

à la Faculté de Médecine de DIJON

et soutenue publiquement le 27 novembre 1981

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

GRANGERET Marie-Thérèse épouse VUILLOT

née le 2 février 1951

à VESOUL (Haute Saône)

FACULTE DE MEDECINE DE DIJON

Année 1981 - N*

# EFFET TROPHIQUE IN VITRO DES HORMONES GASTROINTESTINALES SUR DES LIGNEES DE CELLULES CANCEREUSES GASTRIQUES ET COLIQUES ETABLIES CHEZ LE RAT

**T H E S E**

présentée

à la Faculté de Médecine de DIJON

et soutenue publiquement le 27 novembre 1981

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

GRANGERET Marie-Thérèse épouse VUILLOT

née le 2 février 1951

à VESOUL (Haute Saône)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. GUERRIN, Doyen
M. J.P. DIDIER, Assesseur
M. R. PUTELAT, Assesseur
M. L. JEANNIN, Assesseur
M. M. DAVID, Assesseur

M. J. BALLIVET, Professeur Honoraire
M. F. BARON, Professeur Honoraire
M. J. GUYOT, Professeur Honoraire
Mlle G. PALLOT, Professeur Honoraire
M. G. RUCART, Professeur Honoraire

## PROFESSEURS TITULAIRES

| | |
|---|---|
| Anatomie et organogénèse | P. BARRY |
| Anatomie Pathologique | R. MICHIELS |
| Biochimie | P. PADIEU |
| Carcinologie | F. CABANNE, Doyen Honoraire |
| Chirurgie Générale | P. AUPECLE |
| Clinique Chirurgicale | H. VIARD |
| Clinique Médicale | P. CORTET |
| Clinique Gynécologique et Obstétricale | J. JAHIER |
| Clinique Médicale Infantile | M. ALISON |
| Hépato-Gastro-Entérologie | Cl. KLEPPING |
| Histologie | P. ZAHND |
| Immunologie | F. MARTIN |
| Médecine Légale et Toxicologie | A. MARIN |
| Pathologie Chirurgicale | C. FERRY |
| Pathologie Médicale | R. PUTELAT |
| Physiologie | J. KLEPPING |
| Radiologie (Diagnostic) | J.P. MABILLE |
| Sémiologie Médicale | J.B. BOUHEY |

## PROFESSEURS SANS CHAIRE

| | |
|---|---|
| Anesthésiologie | B. CAILLARD |
| Biochimie | J. DEDREUX |
| Carcinologie | J. GUERRIN |
| Cardiologie | P. LOUIS |
| Chirurgie Générale | S. BRIET - G. PIGANIOL |
| Médecine Interne | M. GAUDET |
| Médecine préventive santé publique, Hygiène | M. CARON |
| Neurochirurgie | A. THIERRY |
| Parasitologie | P. CAMERLYNCK |
| Pédiatrie | J.L. NIVELON |
| Pharmacologie | A. ESCOUSSE |
| Pneumologie, Phtysiologie | L. JEANNIN |
| Thérapeutique, Réanimation Médicale, Rééducation Fonctionnelle et Hydrologie | J.P. DIDIER |

## MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

| | |
|---|---|
| Anatomie et Organogénèse | J.M. AUTISSIER |
| Anatomie Pathologique | E. JUSTRABO |
| Anesthésiologie | M. WILKENING |
| Bactériologie, Virologie | A. KAZMIERCZAK |
| Biochimie Médicale | G. MACK |
| Chirurgie Générale | J.P. FAVRE |
| Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire | M. DAVID |
| Dermatologie, Vénéréologie | D. LAMBERT |
| Endocrinologie, métabolisme, nutrition | J.M. BRUN |
| Gynécologie et Obstétrique | J.P. FELDMAN |
| Hématologie et Maladies du sang | J. BONHOMME |
| Hépatologie-Gastro-Entérologie | J. FAIVRE |
| Mathématiques, statistiques, informatique médicale | Mme L. DUSSERRE |
| Nephrologie | G. RIFLE |
| Neurologie | R. DUMAS |
| Orthopédie, traumatologie, chirurgie plastique et reconstructive | P. GRAMMONT |
| O.R.L. | Ph. ROMANET |
| Psychiatrie | P. TRAPET |
| Radiologie (Diagnostic) | M. WEILLER<br>D. BINNERT |
| Radiologie (Thérapie) | J.C. HORIOT |
| Rhumatologie | J. STRAUSS |
| Stomatologie et Chirurgie maxillo-faciale | G. MALKA |

AGREGE LIBRE

Ophtalmologie P.G. MOREAU

--=oOo=--

La Faculté de Médecine de Dijon déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

---

JURY DE LA THESE

Président : Monsieur le Professeur F. MARTIN

Membres : Monsieur le Professeur H. VIARD
Monsieur le Professeur Agrégé J.C. HORIOT
Monsieur le Professeur Agrégé J. FAIVRE

A mon Mari,

Avec toute mon affection et ma reconnaissance pour le soutien qu'il a toujours su m'apporter

A mes Filles chéries, Nadia et Anne.

A mes Parents.

A mes Beaux-parents.

A toute ma Famille.

A mes Amis.

A notre Maître,

Monsieur le Professeur F. CABANNE

Qui nous a acceuilli au Centre Georges François Leclerc pendant nos stages hospitaliers.

A nos Maîtres,

Qui, dans ce Centre, nous ont si bien enseigné la Cancérologie.

Qu'ils veuillent trouver ici l'expression de toute notre gratitude.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur F. MARTIN,

Il nous a fait le très grand honneur d'accepter la Présidence de notre jury de thèse.

La disponibilité dont il a fait preuve, malgré une activité incessante, sa passion pour la Recherche qu'il sait très vite nous communiquer ne font que forcer notre admiration.

Qu'il veuille bien trouver dans ce modeste travail l'expression de notre gratitude.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY :

Monsieur le Professeur H. VIARD

Monsieur le Professeur Agrégé J.C. HORIOT

Monsieur le Professeur Agrégé J. FAIVRE

qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail.

Qu'ils veuillent bien accepter nos plus sincères remerciements et l'expression de nos sentiments respectueux.

Nous remercions

Monsieur le Docteur O. KOBORI, de l'UNIVERSITE DE TOKYO, pour son étroite et constante collaboration qui a permis la réalisation de ce travail.

Au Laboratoire d'Immunologie et de Médecine Expérimentale de la Faculté de Médecine de Dijon, il fut un des Pionniers de cette voie de Recherche.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre gratitude et de notre amitié.

Nous remercions

Tous les membres du Laboratoire d'Immunologie et de Médecine Expérimentale de la Faculté de Médecine de Dijon et en particulier Madame Annick LECLERC, son aide constante fut très précieuse dans la réalisation de ce travail.

## *SERMENT D'HIPPOCRATE*

*Devant l'effigie d'HIPPOCRATE, en présence des Maîtres de cette Faculté et de mes Condiscibles.*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*

*Je donnerai gratuitement mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail; je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés; et mon état ne servira ni à corrompre les moeurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois déshonoré et méprisé de mes Confrères si j'y manque.*

# I N T R O D U C T I O N

Au cours des dernières années, la thérapeutique des cancers digestifs a peu progressé et ces cancers sont demeurés au premier rang chez l'homme et chez la femme :
Sur une population de 455 727 habitants, étudiée en côte d'Or de 1976 à 1980, 1 702 nouveaux cas de cancers digestifs ont été diagnostiqués pour la première fois en cinq ans.
La survie à trois ans n'est que de 15 % pour les malades atteints d'un cancer de l'estomac et de 34 % pour les malades atteints d'un cancer colorectal, (6).

Des méthodes thérapeutiques nouvelles pourraient résulter d'une connaissance plus approfondie de la biologie de ces cancers :
Au cours des cinq dernières années, on s'est aperçu que des peptides appartenant au groupe des Hormones Gatrointestinales pouvaient avoir un rôle important dans la régulation de la croissance du tissu du tractus digestif, JOHNSON L R. (2).

Au Laboratoire d'Immunologie et de Médecine Expérimentale de la Faculté de Médecine de Dijon, deux lignées cellulaires ont été isolées à partir d'un cancer gastrique et d'un cancer colique chimio-induits chez le rat, (3) et (7).
Il était donc très intéressant d'étudier *IN VITRO* l'action de peptides apparentés et d'hormones digestives sur ces cellules.

Dans ce but, les cultures réalisées dans un système Microtest et une technique colorimétrique, comparable en sensibilité et en reproductibilité aux techniques d'incorporation de molécules marquées, (4), ont permis d'étudier quantitativement la croissance cellulaire.

# - MATERIEL ET METHODE -

Les hormones et autres peptides ont été testés de façon simultannée sur deux lignées de cellules cancéreuses d'origine digestive.

## 1- LES CELLULES UTILISEES

1.1 La lignée DHD K12 : Elle a été établie à partir d'un carcinome colique transplantable.

. La tumeur primaire est chimio-induite par le 1,2 dimethylhydrazine (DMH) chez des rats de souche BD IX, Martin M.S 1976 (7).

. Des passages successifs de la tumeur primaire ont été réalisés par greffes sous-cutanées chez des rats syngéniques.

. Les primo-cultures ont été établies à partir de cette tumeur intestinale greffée, puis elles ont été purifiées, c'est à dire, débarrassées de leur contigent fibroblastique et monocytaire.

. Par subculture, une lignée épithéliale stricte fut obtenue.

1.2 La lignée BV9 : Elle a été établie à partir d'un cancer gastrique transplantable.

. La tumeur est un adénocarcinome chimio-induit au niveau de l'estomac glandulaire de rats de souche Wistar par l'administration per os de N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), O. Kobori 1979 (3).

. Après quatre passages de la tumeur primitive sur des rats syngéniques mâles par greffes sous-cutanées, des primo-cultures furent réalisées.

. La lignée épithéliale obtenue fut subcultivée au moins trente cinq fois.

Ces deux lignées de cellules cancéreuses, toutes deux établies au Laboratoire d'Immunologie et de Médecine Experimentale de la Faculté de Médecine de Dijon, ont en commun :

. Leur origine digestive,

. Leurs caractères épithéliale stricte et permanent par le fait que l'injection sous-cutanée à l'animal syngénique de ces cellules reproduit un adénocarcinome identique à la tumeur primitive.

## 2- MODE DE CULTURE

Les cellules DHD et BV9, qui sont des cellules adhérentes, sont cultivées dans des flacons *Corning* de 25 $cm^2$ en présence de 10 ml de "milieu nutritif complet".

Ce "milieu nutritif complet" est constitué d'une solution de Ham F10 (*M.A. Bioproducts*) qui ne contient pas d'hormone (formule - Tableau I) auquel est additionnée du serum de veau foetal à la concentration de 4%, du serum de veau nouveau-né à la concentration de 8% (*Microbiological Associates*) et de gentamycine à la concentration de 0,05 mg/ml (*Gentalline 10 Unilabo*).

Les flacons de culture sont placés dans une étuve à 37° C, sans atmosphère contrôlée.

Le milieu de culture est renouvelé trois fois par semaine.

La boite "mère" est divisée lorsque les cellules sont confluentes au fond de la boite de culture :

. Le milieu de culture est jeté et remplacé par 1 ml d'EDTA à la concentration de 1% dans une solution de chlorure de sodium tamponnée par des ions phosphates (PBS).

. L'EDTA est laissé quelques minutes dans le flacon puis est jeté.

. On ajoute 2 ml de trypsine (*Microbiological Associates*) à la concentration de 0,25% dans de la solution de Hanks sans $Ca^{++}$ ni $Mg^{++}$ (*Microbiological Associates*).

La trypsine est préchauffée au préalable à 37° C.

# COMPOSITION DU MILIEU DE HAM F10 (par litre)

| | mg/l | µM/l | | mg/l | µM/l |
|---|---|---|---|---|---|
| L-Arginine,HCL | 211,00 | 1 000 | Biotine | 0,024 | 0,1 |
| L-Histidine,HCL | 21,00 | 100 | i-Inositol | 0,541 | 3 |
| L-Lysine,HCL | 29.30 | 160 | Nicotinamide | 0,615 | 5 |
| L-Méthionine | 4,48 | 30 | D-Panthothénate de Calcium | 0,715 | 3 |
| L-Phénylalanine | 4,96 | 30 | Choline,HCL | 0,698 | 5 |
| L-Tryptophane | 0,60 | 3 | Pyridoxine,HCL | 0,206 | 1 |
| L-Tyrosine | 1,81 | 10 | Riboflavine | 0,376 | 1 |
| L-Alanine | 9,00 | 100 | Thymidine | 0,727 | 3 |
| Glycocolle | 7,51 | 100 | Cyanocobalamine | 1,360 | 1 |
| L-Serine | 10,50 | 100 | Pyruvate de Na | 110,0 | 1 000 |
| L-Thréonine | 3,57 | 30 | Acide lipoïque | 0,200 | 1 |
| L-Acide Aspartique | 13,30 | 100 | $CaCL_2,2H_2O$ | 44,00 | 300 |
| L-Acide Glutamique | 14,70 | 100 | $MgSO_4,7H_2O$ | 152,80 | 620 |
| L-Asparagine | 15,00 | 100 | Chlorure de Na | 7 400,0 | 120 000 |
| L-Glutamine | 146,20 | 1 000 | D-Glucose | 1 100,0 | 6 100 |
| L-Isoleucine | 2,60 | 20 | Chlorure de K | 285,0 | 3 800 |
| L-Leucine | 13,10 | 100 | $Na_2HPO_4,7H_2O$ | 290,0 | 1 100 |
| L-Proline | 11,50 | 100 | $KH_2PO_4$ | 83,0 | 480 |
| L-Valine | 3,50 | 30 | Rouge de Phénol | 1,2 | 3,3 |
| L-Cystéine,HCL | 31,50 | 200 | $FeSO_4,7H_2O$ | 0,834 | 3 |
| Thiamine,HCL | 1,012 | 3 | $CuSO_4,5H_2O$ | 0,00249 | 0,01 |
| Hypoxanthine | 4,08 | 30 | $ZnSO_4,7H_2O$ | 0,0288 | 0,1 |
| Acide folique | 1,32 | 3 | $NaHCO_3$ | 1 200,0 | 14 300 |
| Eau distillée 6 fois | 1 000 ml | | | | |

TABLEAU I

. Après cinq minutes de contact avec la trypsine, les cellules se détachent au fond de la boite et se dissocient.

. Cette suspension cellulaire est diluée par 10 ml de milieu complet, précedemment décrit, puis est remise en culture dans deux ou plusieurs flacons de cultures "filles".

## 3- LE COMPTAGE ET L'IMPLANTATION DES CELLULES

Les cellules DHD et BV9 à tester sont trypsinisées de la même façon que pour les passages de la lignée et mises en suspension dans 10 ml de milieu complet.

Elles sont filtrées sur une grille métallique stérilisée à la flamme afin de retenir les amas cellulaires et faciliter le comptage.

Le nombre de cellules est compté sur un hémocytomètre de Malassez après dilution de moitié d'une aliquote de 500 µl avec du bleu trypan. Seules les cellules vivantes non colorées par le bleu trypan sont comptées.

Les cellules sont ensuite mises en suspension dans 20 ml de milieu complet à raison de 50 000 cellules par ml pour les DHD et 200 000 cellules pour les BV9.

Ainsi un nombre de 10 000 cellules DHD et 40 000 cellules BV9 sont réparties dans 200 µl dans les puits d'une plaque *micro test II (Falcon plastic)*.

Chaque lignée cellulaire est testée sur une plaque différente.

Les plaques utilisées pour ce test de "facilitation" de la croissance cellulaire par l'addition d'hormone sont perçées de 96 puits de 300 µl chacun.

Ces puits sont disposés sur 12 colonnes (chiffrés de 1 à 12) en partant de la gauche vers la droite.

Chaque colonne comprends 8 puits (étiquettés de A à H).

Lors de l'implantation des cellules, seule la première colonne ne sera pas utilisée car elle servira à "faire le zéro" du spectrophotomètre lors de la lecture des résultats

## 4- LES HORMONES ET LES PEPTIDES TESTES

### 4.1 Leur origine et leur présentation

. LE GLUCAGON, extrait de pancréas de porc et de boeuf, est sous forme de poudre cristalline, *Sigma Chemical Co., St Louis, Mi.*

. L'INSULINE, extraite de pancréas de boeuf, est sous forme de poudre cristalline, *Sigma Chemical Co., St Louis, Mi.*

. LES ANALOGUES DE LA SEQUENCE "C-terminal tetrapeptide" DE LA GASTRINE :

- Le peptavlon (pentagastrine) ou N-tert-butyloxycarbonyl-β-alanyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamide est présenté sous forme d'ampoule de 2 ml de solution contenant 500 µg du produit, *Imperial Chemical Industries, Macclesfield Cheshire.*

- La gastopsine (amogastrine) ou N-tert-amyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylaninamide est sous forme de poudre, *Nihon Kayaku Co., Tokyo, Japan.*

- Le N-tert-amyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamide, sous forme de poudre, *Sigma Chemical Co., St Louis, Mi.*

- Le N-tert-butyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamide, sous forme de poudre, *Sigma Chemical Co., St Louis, Mi.*

. LES AUTRES PEPTIDES

- La L-phenylalaninamide hydrochloride sous forme de poudre cristalline,

- La L-aspartyl-L-phenylalaninamide sous forme de poudre cristalline,

- La L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamide, sous forme de poudre également.

Ces peptides sont des produits *Sigma Chemical Co., St Louis, Mi.*
Par ailleurs, il est à noter que ces peptides et ceux appartenant à la sequence "C-terminal tetrapeptide" de la Gastrine sont des produits de synthèse.

4.2 Leur protocole d'utilisation

. Les solutions stock du Glucagon et de l'Insuline furent préparées dans de l'eau déminéralisée contenant 5 mM HCl.
Les differentes concentrations à tester de ces produits furent préparées à partir de ces solutions stock diluées dans du milieu de Ham F10 avec une concentration finale de 0,5% en 5mM HCl.

. Concernant le N-t-amyloxycarb-L-tryp-L-meth-L-asp-L-phenylamide, le N-t-butyloxycarb-L-tryp-L-meth-Lasp-L-phenylamide et le L-tryp-L-meth-L-asp-L-phenylamide, produits par *Sigma*, furent dissouts dans du dimethylsulfoxide (DMSO) *Merk*.
Les solutions stock de ces produits furent diluées dans du milieu de Ham F10 avec des concentrations respectives de 0,5% et 0,4% en DMSO.
Lors de la réalisation de ces tests, des colonnes témoins contenant ces solvants furent comparées à la colonne test ne contenant que du milieu de Ham F10 afin de mettre en évidence leur éventuelle toxicité cellulaire aux concentrations utilisées.

. Les autres hormones et les autres peptides ont été dissouts directement dans du milieu de Ham F10.

Dans un premier temps : Les produits ont été testés à la recherche des concentrations donnant des valeurs de croissance cellulaires optimales.

Dans un deuxième temps : Connaissant ces valeurs, des associations de deux hormones (appartenant pour l'une à la famille de la Secretine et pour l'autre à la famille de la Gastrine) ont été testées de la manière suivante :

Sur une même plaque, application des deux produits séparément et en association à des concentrations croissantes pour les deux ou croissantes pour l'un et fixes pour l'autre.

5- DESCRIPTION DU TEST

Après avoir implanté les cellules DHD et les cellules BV9 dans les puits des plaques *Falcon Microtest* comme il a été décrit, les plaques

sont recouvertes d'un film translucide, adhésif, *Falcon 3044*, afin d'éviter l'évaporation et la contamination de leur contenu.

Toutes ces manipulations sont effectuées stérilement sous hotte à flux laminaire.

Pendant 48 heures les plaques sont placées dans un incubateur à 37° C sous 5% de $CO^2$ et atmosphère humide.

Après ces 48 heures, la monocouche cellulaire de chaque puits est lavée deux fois par 200 µl de milieu de Ham F10.
Le liquide surnageant est aspiré au moyen d'un petit sapirateur *Atomisor* auquel est adapté une seringue stérile.
Cette opération a pour but de retirer des puits les cellules mortes et leurs débris, mais surtout, le serum qui avait servi à implanter les cellules au départ du test.
Les hormones et les peptides, dissouts dans 200 µl de milieu sans serum, sont ajoutés dans les puits, colonne par colonne à des concentrations croissantes en partant de la gauche vers la droite de la plaque.

- La première colonne, non implantée, permettra de "faire le blanc" au moment de la lecture par spectrophotométrie,
- La deuxième colonne recevra du "milieu nutritif complet",
- La troisième, le "milieu sans serum", et la quatrième ou la douzième (selon les besoins) le ou les solvants utilisés.

Les plaques, ainsi traitées, sont replacées à nouveau dans l'incubateur à 37° C pendant 72 heures puis on arrête le test.

## 6- L'ARRET DU TEST

. Après cette incubation de 72 heures, les plaques sont vidées de leur milieu de culture. Elles sont rincées rapidement avec du tampon phosphate (PBS) à pH 7,4, ce qui permet d'éliminer les protéines du milieu qui précipiteraient avec la solution fixatrice.

. Les cellules adhérant au fond de chaque puits sont fixées avec du formol à 10% tamponné par du tampon phosphate.
La fixation dure 15 minutes.

. Après fixation, les plaques sont vidées et abondamment rincées par du tampon borate dilué 10 fois à pH 8,5.
Les plaques sont laissées sèchées pendant 15 minutes.

. Puis on applique à chaque puits, y compris ceux de la première colonne, 100 µl d'une solution de bleu de méthylène à 0,5% dans du tampon borate dilué 10 fois.
La coloration des cellules au bleu de méthylène dure pendant 30 minutes.

. Après coloration, les microplaques sont soigneusement lavées avec du PBS concentré afin déliminer le colorant en excès.
Les plaques sont sèchées pendant une heure environ à l'air libre.

. Pour éluer le bleu de méthylène, on ajoute à chaque puits coloré 100 µl de HCl 0,1 N, on recouvre les plaques pour éviter toute évaporation et on attend 1 heure.

## 7- L'INTERPRETATION DU TEST

Pour déterminer le nombre des cellules adhérant au fond de chaque puits une méthode colorimétrique indirecte fut décrite (4).
La densité optique du bleu de méthylène élué dans chaque puits est proportionnelle au nombre de cellules adhérant à ces puits.

On a utilisé un nouvel appareil mis au point par les *Laboratoires FLOW* qui permet une lecture directe des densités optiques après élution du bleu de méthylène par l'HCl 0,1 N.
Cet appareil, *Titertek Multiscan*, après avoir choisi un filtre de longueur d'ondes de 640 nm (spectre donnant le maximum d'absorption du bleu de méthylène), nous donne une lecture automatique en 1 minutes. Le blanc est soustrait automatiquement grâce à une lecture préalable de la première colonne par l'appareil et les résultats sont imprimés simultanément.

Les valeurs obtenues pour chaque puits sont comparées avec celles correspondant aux puits du rang témoin. La difference a été étudiéepar deux tests statistiques :

- Le test t de Student apparié, il a permis de calculer le pourcentage de croissance des rangs contenant les cellules

et les hormones par rapport au rang témoin ne contenant que des cellules poussant dans du milieu sans serum.

- Le test U de Mann et Whitney, test non paramétrique, lorsque l'on a voulu comparer la croissance cellulaire obtenue avec une seule hormone à celle obtenue avec l'association de deux.

Ces tests statistiques ont été effectués sur une calculatrice *Hewlett-Packard*.

# - R E S U L T A T S -

Afin de rassembler nos résultats, pour chaque produit testé, nous avons choisi :

. D'une part, de classer dans un tableau par ordre croissant les taux optimum de facilitation de la croissance cellulaire donnés par la formule suivante :

$$\text{Taux optimal} = \frac{\text{D.O moyenne des cellules avec hormones}}{\text{D.O moyenne des cellules contrôles}} \times 100$$

et d'en prendre la valeur médiane.

. D'autre part, d'établir une courbe représentative des valeurs moyennes des taux de facilitation pour les diverses concentrations utilisées.

## 1- LE GLUCAGON

### 1.1 Concernant la lignée DHD K12 :

- Le tableau II montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 9/11 expériences avec $p < 0,001$. La valeur médiane de ce taux est de 188 % avec pour extrèmes 117 et 408 %. Au cours des 9 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de croissance optimale se situe entre 25 et 100 µg/ml.

- La courbe figure I, établie à partir de 11 plaques, présente son sommet vers 210 % pour une concentration de 25 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 93 - tableau III, le taux optimal est de 408 % pour une concentration de 25 µg/ml.

### 1.2 Concernant la lignée BV9 :

- Le tableau II montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 10/12 expériences avec $p < 0,001$. La valeur médiane de ce taux se situe vers 202 % avec pour extrèmes 139 et 241 %.

TABLEAU II

*GLUCAGON*

| Lignée cellulaire | N° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 $10^4$cel. par puits | 64 | 117 % | 10 | NS |
| | 43 | 132 % | 100 | < 0,01 |
| | 62 | 140 % | 80 | < 0,001 |
| | 44 | 154 % | 100 | < 0,001 |
| | 45 | 187 % | 30 | < 0,001 |
| | *47* | *188 %* | *50* | *< 0,001* |
| | 35 | 242 % | 30 | < 0,001 |
| | 36 | 246 % | 50 | < 0,001 |
| | 94 | 247 % | 50 | < 0,001 |
| | 72 | 321 % | 100 | < 0,001 |
| | 93 | 408 % | 25 | < 0,001 |
| BV9 4 x $10^4$cel. par puits | 91 | 139 % | 25 | < 0,05 |
| | 42 | 164 % | 30 | < 0,001 |
| | 67 | 170 % | 30 | < 0,001 |
| | 66 | 171 % | 20 | < 0,001 |
| | 69 | 171 % | 50 | < 0,001 |
| | *38* | *196 %* | *20* | *< 0,001* |
| | *92* | *208 %* | *25* | *< 0,01* |
| | 51 | 214 % | 25 | < 0,001 |
| | 37 | 230 % | 20 | < 0,001 |
| | 49 | 230 % | 25 | < 0,001 |
| | 50 | 232 % | 50 | < 0,001 |
| | 52 | 241 % | 25 | < 0,001 |

La valeur médiane du taux optimal de facilitation de la croissance cellulaire est de *188 %* pour les cellules DHD K12 et se situe vers *202 %* pour les cellules BV9.

GLUCAGON

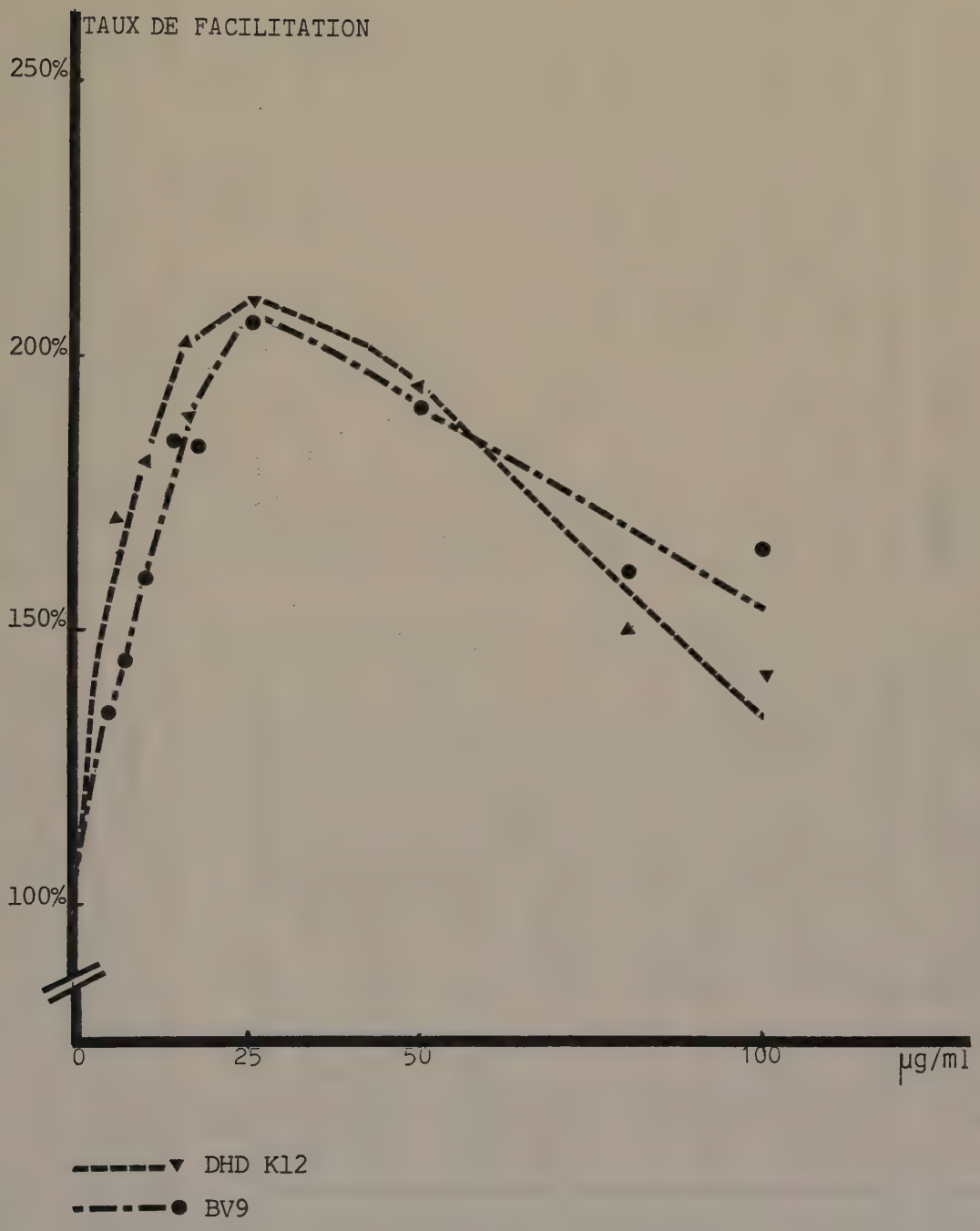



FIGURE I

# TABLEAU III - *GLUCAGON (en µg/ml)*

Association Glucagon/Amyloxycarb.Tryp.Meth.Asp.Phe-$NH_2$ *Sigma.*

## LIGNEE DHD K12

PLAQUE N° 93 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | Ham | Ham + DMSO+ HCl | 0 / 25 | 6,25 / 0 | 6,25 / 25 | 12,5 / 0 | 12,5 / 25 | 25 / 0 | 25 / 25 | 50 / 0 | 50 / 25 |
| | | | | | | | | | | | | | GLU / Amyl TG |
| A | | 35 | 41 | 174 | 132 | 195 | 185 | 240 | 225 | 227 | 178 | 226 |
| B | | 48 | 73 | 155 | 124 | 193 | 256 | 192 | 208 | 202 | 132 | 218 |
| C | | 39 | 38 | 163 | 113 | 190 | 139 | 171 | 271 | 200 | 199 | 242 |
| D | | 70 | 61 | 186 | 125 | 179 | 205 | 209 | 182 | 237 | 278 | 219 |
| E | | 69 | 43 | 148 | 116 | 163 | 164 | 231 | 183 | 222 | 173 | 183 |
| F | | 53 | 44 | 173 | 118 | 178 | 157 | 225 | 203 | 206 | 182 | 224 |
| J | | 43 | 41 | 175 | 131 | 167 | 137 | 202 | 177 | 217 | 214 | 202 |
| H | | 70 | 59 | 261 | 133 | 167 | 151 | 235 | 186 | 162 | 168 | 173 |
| $\overline{X}$ | | 53 | 50 | 179 | 124 | 179 | 174 | 213 | 204 | 209 | 191 | 211 |
| SD | | 15 | 13 | 35 | 8 | 13 | 40 | 24 | 31 | 23 | 43 | 23 |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/3 | 9/3 | 10/3 | 11/3 | 12/3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 358% | 248% | 358% | 348% | 426% | 408% | 418% | 382% | 422% |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |

## LIGNEE BV9

PLAQUE N° 52 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | M.C. | Ham + HCl | 6,25 | 6,25 | 12,5 | 12,5 | 25 | 25 | 50 | 50 | Ham + HCl |
| A | | 755 | 281 | 425 | 453 | 521 | 516 | 663 | 683 | 648 | 694 | 312 | |
| B | | 919 | 350 | 539 | 421 | 592 | 626 | 719 | 756 | 780 | 815 | 403 | |
| C | | 879 | 257 | 465 | 507 | 685 | 572 | 709 | 737 | 709 | 856 | 339 | |
| D | | 904 | 291 | 495 | 466 | 741 | 614 | 729 | 808 | 794 | 869 | 313 | |
| E | | 937 | 327 | 496 | 497 | 595 | 644 | 876 | 901 | 756 | 848 | 337 | |
| F | | 850 | 318 | 523 | 486 | 812 | 598 | 747 | 845 | 815 | 812 | 300 | |
| J | | 947 | 318 | 470 | 444 | 589 | 530 | 752 | 699 | 681 | 789 | 305 | |
| H | | 905 | 324 | 447 | 439 | 616 | 597 | 739 | 778 | 733 | 797 | 322 | |
| $\overline{X}$ | | | | 473 | | 616 | | 759 | | 765 | | | |
| SD | | | | 35 | | 78 | | 69 | | 71 | | | |

| COMPARAISON | 4 + 5 / 3 + 12 | 6 + 7 / 3 + 12 | 8 + 9 / 3 + 12 | 10+11 / 3 + 12 | |
|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 150 % | 196 % | 241 % | 243 % | |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | |

Au cours des 10 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de facilitation optimal se situe 25 et 50 µg/ml.

- La figure I, établie à partir de 12 plaques, présente son sommet vers 208 % pour une concentration de 25 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 52 - tableau III, le taux optimal est de 241 % pour une concentration de 25 µg/ml.

Au niveau des deux lignées, on observe une toxicité pour des concentrations supérieures à 100 µg/ml.
Compte tenu du nombre de plaques réalisées et de l'allure des courbes moyennes figure I, on peut affirmer que l'action du Glucagon est identique au niveau de ces deux lignées.

2- L'INSULINE

2.1 Concernant la lignée DHD K12 :

- Le tableau IV ne montre aucune augmentation significative de la croissance cellulaire au cours des 7 expériences réalisées.

- La courbe figure II , établie à partir de 7 plaques, présente son sommet vers 110 % pour des valeurs situées entre $250x10^{-6}$ et $2,5x10^{-3}$ µg/ml.

- Tableau V, la plaque N°102 nous montre une inhibition de la croissance cellulaire qui n'est pas toujours très significative.

2.2 Concernant la lignée BV9 :

- Le tableau IV ne montre également aucune augmentation significative de la croissance cellulaire au cours des 3 expériences réalisées.

-La courbe figure II, réalisée à partir de 3 plaques, montre très tôt une inhibition de la croissance cellulaire vers une valeur de $250x10^{-3}$µg/ml

- Tableau V, la plaque N° 25 OK montre une inhibition significative de la croissance cellulaire à partir d'une valeur de $25x10^{-3}$µg/ml.

TABLEAU IV

*INSULINE*

| Lignée cellulaire | N ° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 $10^4$cel. par puits | 2 | 87 % | 1 | < 0,001 |
| | 102 | 107 % | $2,5 \times 10^{-3}$ | NS |
| | 3 | 108 % | 0,1 | NS |
| | *103* | *112 %* | *$2,5 X10^{-6}$* | *NS* |
| | 104 | 113 % | $2,5 \times 10^{-3}$ | NS |
| | 105 | 118 % | $250 \times 10^{-6}$ | NS |
| | 101 | 119 % | $25 \times 10^{-3}$ | < 0,05 |
| BV9 4 x $10^4$cel. par puits | 25 OK | 85 % | $25 \times 10^{-3}$ | < 0,001 |
| | *35 OK* | *95 %* | *$250 X10^{-3}$* | *< 0,01* |
| | 14 OK | 110 % | $10 \times 10^{-3}$ | NS |

Nous n'observons aucune facilitation de la croissance cellulaire par l'Insuline au niveau des deux lignées cellulaires.

INSULINE

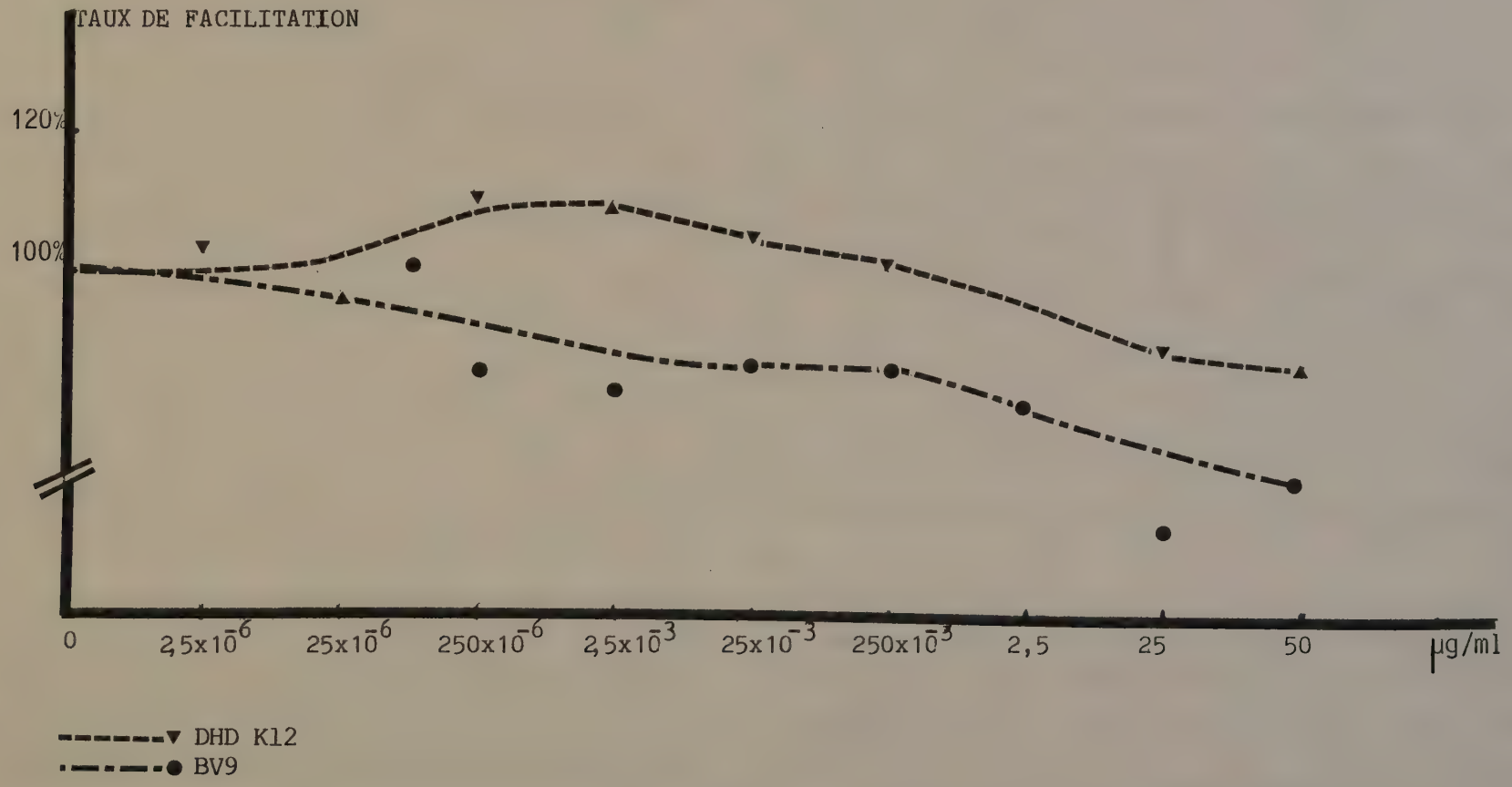



FIGURE II

# TABLEAU V - *INSULINE (en µg/ml)*

LIGNEE DHD K12

PLAQUE N° 102 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| 0 | Ham | Ham + HCl | 250 x$10^{-6}$ | 2,5 x$10^{-3}$ | 25 x$10^{-3}$ | 250 x$10^{-3}$ | 2,5 | 25 | 50 | 100 | Ham + HCl |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 166 | 225 | 224 | 229 | 207 | 192 | 173 | 180 | 182 | 184 | 257 |
| B | 320 | 252 | 251 | 263 | 218 | 220 | 203 | 260 | 246 | 201 | 299 |
| C | 222 | 284 | 217 | 289 | 217 | 211 | 208 | 206 | 231 | 176 | 272 |
| D | 220 | 240 | 286 | 254 | 262 | 195 | 205 | 224 | 199 | 190 | 228 |
| E | 237 | 266 | 278 | 261 | 199 | 173 | 181 | 287 | 212 | 182 | 256 |
| F | 232 | 210 | 324 | 323 | 195 | 185 | 214 | 181 | 182 | 157 | 224 |
| J | 213 | 238 | 240 | 240 | 204 | 196 | 227 | 146 | 151 | 187 | 253 |
| H | 215 | 221 | 193 | 205 | 213 | 209 | 146 | 146 | 129 | 145 | 222 |
| $\bar{X}$ | 228 | 242 | 252 | 258 | 214 | 198 | 195 | 204 | 192 | 178 | 251 |
| SD | 43 | 25 | 43 | 36 | 21 | 15 | 26 | 51 | 39 | 18 | 26 |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/3 | 9/3 | 10/3 | 11/3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 104% | 107% | 88% | 82% | 81% | 84% | 79% | 74% | |
| P < | NS | NS | 0,05 | 0,01 | 0,01 | 0,05 | 0,01 | 0,001 | |

LIGNEE BV9

PLAQUE N° 25 OK — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| 0 | | | Ham+ HCl | 25 | 2,5 | 250 x$10^{-3}$ | 25 x$10^{-3}$ | 2,5 x$10^{-3}$ | 250 x$10^{-6}$ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | 98 | 55 | 56 | 77 | 89 | 75 | 79 | | |
| B | | | 95 | 60 | 64 | 77 | 89 | 95 | 78 | | |
| C | | | 93 | 62 | 71 | 87 | 97 | 95 | 101 | | |
| D | | | 94 | 58 | 69 | 72 | 88 | 89 | 90 | | |
| E | | | 105 | 58 | 67 | 81 | 86 | 79 | 95 | | |
| F | | | 110 | 65 | 72 | 75 | 79 | 87 | 89 | | |
| J | | | 120 | 63 | 75 | 75 | 82 | 84 | 76 | | |
| H | | | 91 | 58 | 51 | 77 | 74 | 70 | 77 | | |
| $\bar{X}$ | | | 101 | 60 | 66 | 78 | 86 | 84 | 86 | | |
| SD | | | 10 | 3 | 8 | 5 | 7 | 9 | 9 | | |

| COMPARAISON | | 5/4 | 6/4 | 7/4 | 8/4 | 9/4 | 10/4 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | | 59% | 66% | 77% | 85% | 83% | 85% | | |
| P < | | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | NS | NS | | |

Au niveau des deux lignées, l'Insuline peut être considérée comme un inhibiteur de la croissance cellulaire dans le cadre de nos expériences.

3- LE PEPTAVLON (Pentagastrine)

3.1 Concernant la lignée DHD K12 :

- Le tableau VI montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 7/17 expériences avec $p < 0,001$.
La valeur médiane de ce taux est de 137 % avec pour extrèmes 98 et 264 %.
Au cours de ces 7 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de facilitation optimale se situe entre 12,5 et 50 µg/ml.

- La courbe figure III, établie à partir de 18 plaques, présente son sommet vers 148 % pour une concentration de 20 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 14 - tableau VII, le taux optimal est de 264 % pour une concentration de 20 µg/ml.

3.2 Concernant la lignée BV9 :

- Le tableau VI montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 5/9 expériences avec $p < 0,001$.
La valeur médiane de ce taux est de 130 % avec pour extrèmes 105 et 162 %.
Au cours des 5 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de facilitation optimale se situe entre 10 et 50 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 12 - tableau VII, le taux optimal est de 162 % pour une concentration de 10 µg/ml.

Au niveau des deux lignées, le Peptavlon devient toxique pour des concentrations supérieures à 100 µg/ml.
Compte tenu des difficultés de reproductibilité de ces expériences et que selon J S. MORLEY (9) la Pentagastrine est l'analogue de la Gastrine le plus efficace en expérimentation *IN VIVO* concernant l'activité secrétoire sur des rats anesthésiés, nous avons testé côte à côte sur la même

TABLEAU VI

*PEPTAVLON (Pentagastrine)*

| Lignée cellulaire | N ° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 $10^4$cel. par puits | 75 | 98 % | 25 | NS |
| | 4 | 102 % | 10 | NS |
| | 21 | 107 % | 5 | NS |
| | 73 | 112 % | 50 | NS |
| | 74 | 112 % | 50 | NS |
| | 20 | 118 % | 10 | < 0,05 |
| | 40 | 122 % | 20 | < 0,001 |
| | 29 | 135 % | 30 | < 0,05 |
| | *9* | *137 %* | *10* | *< 0,05* |
| | 83 | 145 % | 12,5 | < 0,001 |
| | 28 | 149 % | 40 | < 0,01 |
| | 41 | 160 % | 50 | < 0,001 |
| | 31 | 163 % | 10 | < 0,001 |
| | 32 | 164 % | 25 | < 0,05 |
| | 84 | 165 % | 25 | < 0,001 |
| | 13 | 221 % | 10 | < 0,001 |
| | 14 | 264 % | 20 | < 0,001 |
| BV9 4 x $10^4$cel. par puits | 39 | 105 % | 15 | < 0,05 |
| | 80 | 102 % | 25 | NS |
| | 81 | 116 % | 12,5 | < 0,001 |
| | 25 | 126 % | 20 | NS |
| | *26* | *130 %* | *20* | *< 0,05* |
| | 8 | 146 % | 10 | < 0,001 |
| | 33 | 149 % | 20 | < 0,001 |
| | 34 | 160 % | 40 | < 0,001 |
| | 12 | 162 % | 10 | < 0,001 |

La valeur médiane du taux optimal de facilitation de la croissance cellulaire est de *137 %* pour les cellules DHD K12 et est de *130 %* pour les cellules BV9.

P E P T A V L O N - (PENTAGASTRINE)

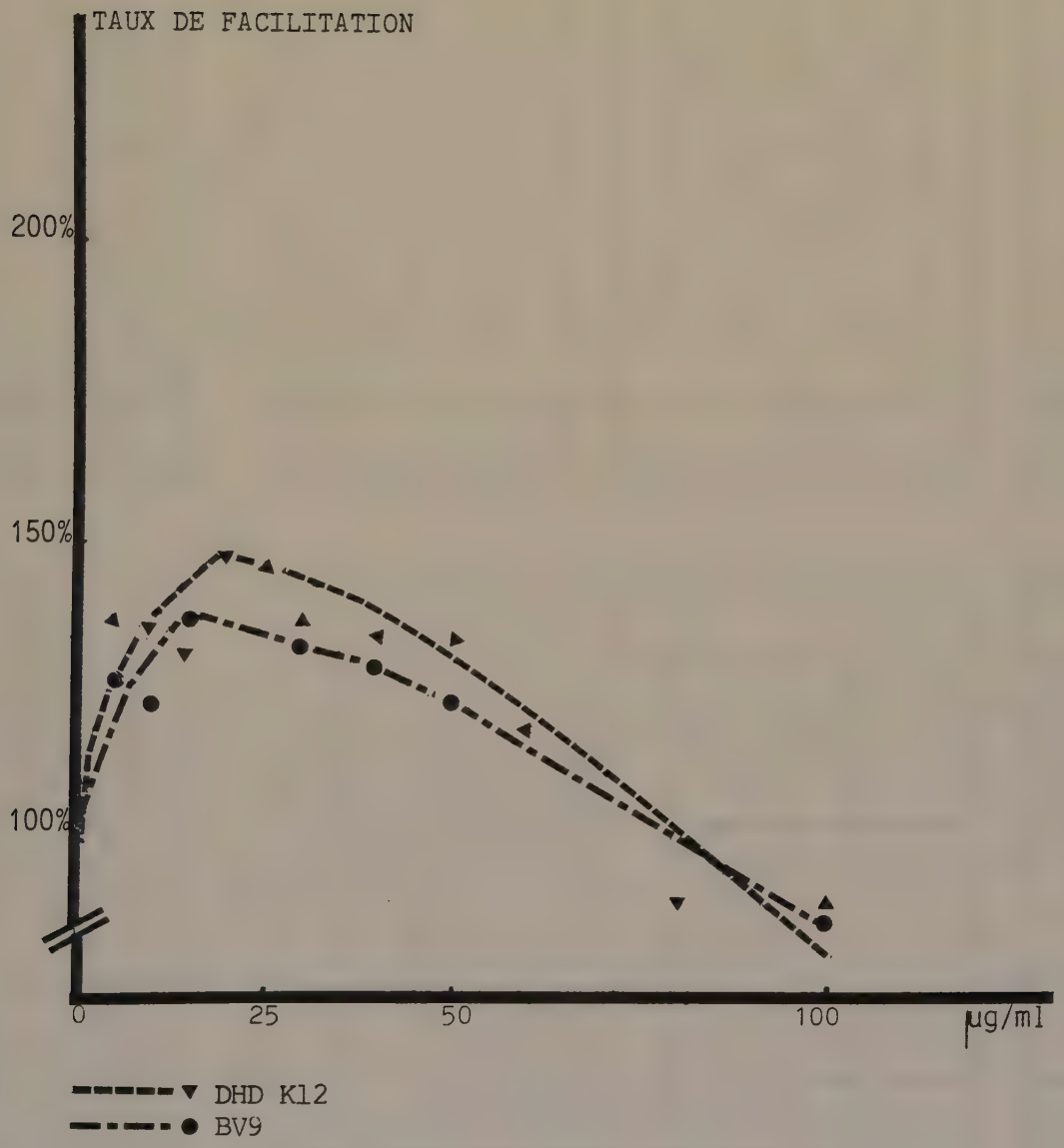



FIGURE III

# TABLEAU VII - *PEPTAVLON (Pentagastrine en µg/ml)*

## LIGNEE DHD K12

PLAQUE N° 14 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| 0 | M.C. | Ham | 1 | 1 | 10 | 10 | 20 | 20 | 50 | 50 | Ham |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | 525 | 119 | 172 | 161 | 198 | 256 | 239 | 241 | 251 | 218 | 81 |
| B | | 690 | 88 | 196 | 204 | 216 | 246 | 283 | 208 | 255 | 227 | 78 |
| C | | 678 | 122 | 178 | 216 | 226 | 243 | 217 | 242 | 264 | 254 | 70 |
| D | | 630 | 120 | 170 | 209 | 228 | 190 | 255 | 225 | 209 | 219 | 92 |
| E | | 694 | 97 | 170 | 175 | 216 | 226 | 227 | 236 | 236 | 203 | 101 |
| F | | 634 | 81 | 157 | 152 | 197 | 194 | 207 | 246 | 192 | 181 | 57 |
| J | | 550 | 92 | 171 | 153 | 205 | 186 | 203 | 234 | 192 | 196 | 61 |
| H | | 599 | 100 | 189 | 178 | 195 | 194 | 245 | 173 | 186 | 168 | 80 |
| $\overline{X}$ | | | | 178 | | 214 | | 230 | | 216 | | |
| SD | | | | 20 | | 22 | | 25 | | 30 | | |

| COMPARAISON | 4 + 5 / 3 + 12 | 6 + 7 / 3 + 12 | 8 + 9 / 3 + 12 | 10 +11 / 3 + 12 | |
|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 198 % | 238 % | 264 % | 240 % | |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | |

## LIGNEE BV9

PLAQUE N° 12 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| 0 | M.C. | Ham | 5 | 5 | 10 | 10 | 20 | 20 | 50 | 50 | Ham |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | 947 | 333 | 533 | 494 | 491 | 503 | 598 | 378 | 613 | 648 | 391 |
| B | | 1062 | 347 | 629 | 492 | 602 | 594 | 580 | 507 | 663 | 653 | 456 |
| C | | 1117 | 365 | 623 | 658 | 568 | 635 | 607 | 518 | 677 | 632 | 401 |
| D | | 1186 | 432 | 715 | 713 | 738 | 664 | 704 | 524 | 671 | 750 | 451 |
| E | | 1172 | 504 | 746 | 772 | 781 | 778 | 762 | 503 | 720 | 724 | 484 |
| F | | 1169 | 497 | 736 | 777 | 797 | 744 | 861 | 602 | 693 | 697 | 417 |
| J | | 1373 | 501 | 800 | 787 | 841 | 743 | 810 | 630 | 746 | 758 | 440 |
| H | | 1345 | 531 | 742 | 816 | 853 | 861 | 811 | 626 | 760 | 741 | 356 |
| $\overline{X}$ | | | | 690 | | 700 | | 626 | | 697 | | |
| SD | | | | 107 | | 122 | | 133 | | 48 | | |

| COMPARAISON | 4 + 5 / 3 +12 | 6 + 7 / 3+12 | 8 + 9 / 3+12 | 10+11 / 3 + 12 | |
|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 160 % | 162 % | 145 % | 161 % | |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | |

# TABLEAU VIII - *COMPARAISON Peptavlon et Gastopsine, Nihon (en µg/ml)*

LIGNEE BV9

PLAQUE N° 25

DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | *Peptavlon* | | | | *Gastopsine, Nihon* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham | 5 | 10 | 20 | 50 | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | 547 | 146 | 180 | 180 | 247 | 168 | 230 | 316 | 287 | 267 | 118 |
| B | | 600 | 165 | 156 | 157 | 188 | 197 | 221 | 262 | 304 | 291 | 123 |
| C | | 603 | 173 | 167 | 166 | 142 | 215 | 223 | 379 | 339 | 299 | 110 |
| D | | 629 | 151 | 277 | 236 | 208 | 246 | 246 | 477 | 410 | 363 | 146 |
| E | | 598 | 131 | 199 | 167 | 264 | 200 | 233 | 434 | 465 | 359 | 161 |
| F | | 595 | 152 | 172 | 135 | 147 | 164 | 211 | 320 | 333 | 272 | 171 |
| J | | 552 | 144 | 183 | 176 | 179 | 210 | 222 | 340 | 295 | 316 | 138 |
| H | | 544 | 183 | 173 | 233 | 197 | 157 | 192 | 315 | 371 | 318 | 127 |
| $\bar{X}$ | | 584 | 156 | 188 | 181 | 197 | 195 | 223 | 355 | 351 | 311 | 137 |
| SD | | 32 | 17 | 38 | 36 | 43 | 30 | 16 | 71 | 62 | 36 | 21 |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/3 | 9/3 | 10/3 | 11/3 | 12/3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 121% | 116% | 126% | 125% | 143% | 228% | 225% | 199% | 88% |
| P < | NS | NS | NS | 0,05 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | NS |

LIGNEE BV9

PLAQUE N° 26

DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | *Peptavlon* | | | | *Gastopsine, Nihon* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham | 5 | 10 | 20 | 50 | 5 | 10 | 25 | 50 | Ham |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | 451 | 101 | 130 | 86 | 149 | 116 | 164 | 250 | 254 | 202 | 117 |
| B | | 524 | 98 | 123 | 105 | 130 | 112 | 194 | 255 | 294 | 230 | 113 |
| C | | 515 | 72 | 86 | 68 | 139 | 122 | 129 | 229 | 304 | 196 | 103 |
| D | | 561 | 81 | 69 | 61 | 112 | 77 | 134 | 220 | 267 | 187 | 91 |
| E | | 487 | 91 | 72 | 103 | 101 | 121 | 163 | 213 | 230 | 156 | 99 |
| F | | 485 | 65 | 83 | 70 | 86 | 77 | 124 | 209 | 235 | 242 | 67 |
| J | | 444 | 90 | 53 | 90 | 112 | 97 | 153 | 232 | 218 | 184 | 77 |
| H | | 444 | 100 | 105 | 80 | 78 | 46 | 104 | 105 | 133 | 89 | 115 |
| $\bar{X}$ | | 489 | 87 | 90 | 100 | 113 | 96 | 145 | 214 | 242 | 186 | 98 |
| SD | | 42 | 13 | 27 | 16 | 25 | 27 | 28 | 47 | 87 | 47 | 18 |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/3 | 9/3 | 10/3 | 11/3 | 12/3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 103% | 115% | 130% | 110% | 167% | 246% | 278% | 214% | |
| P < | NS | NS | 0,05 | NS | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,01 | |

plaque Pentagastrine et amogastrine, *Nihon Kayaku Co.* sur la lignée BV9. Le tableau VIII nous montre que la Pentagastrine est réèllement moins active que l'Amogastrine :

Au niveau de la plaque N° 25 :

Pour une concentration de 10 µg/ml, le taux de croissance pour la Pentagastrine est de 116 % avec p non significatif et un taux de 228 % avec $p < 0,001$ pour l'Amogastrine.

Au niveau de la plaque N° 26 :

Pour une concentration de 20 µg/ml pour la Pentagastrine, le taux de croissance est de 130 % avec $p < 0,05$ et pour une concentration de 25 µg/ml en Amogastrine, le taux de croissance est de 278 % avec $p < 0,001$.

4- LA GASTOPSINE (Amogastrine), *Nihon Kayaku Co.*

4.1 Concernant la lignée DHD K12 :

- Le tableau IX montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 4/5 expériences avec $p < 0,001$.
Au cours de ces 4 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de croissance optimale se situe entre 20 et 25 µg/ml.
La valeur médiane de ce taux est de 136 % avec pour extrèmes 77 et 247 %.

- La courbe figure IV, établie à partir de 6 plaques, présente son sommet vers 160 % pour une concentration de 20 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 71 - tableau X, le taux optimal est de 247 % pour une concentration de 20 µg/ml.

4.2 Concernant la lignée BV9 :

- Le tableau IX montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 8/9 expériences avec $p < 0,001$.
La valeur médiane de ce taux est de 170 % avec pour extrèmes 129 et 278 %.
Au cours de ces 8 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de croissance optimale se situe entre 10 et 50 µg/ml.

- La courbe figure IV, établie à partir de 10 plaques, présente son sommet vers 197 % pour une concentration de 25 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 26 - tableau X, le taux optimal est de 278 % pour une concentration de 25 µg/ml.

TABLEAU IX

*GASTOPSINE (Amogastrine - Nihon Kayaku Co.)*

| Lignée cellulaire | N ° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 $10^4$cel. par puits | 65 | 77 % | 20 | < 0,001 |
| | 63 | 111 % | 5 | NS |
| | *96* | *136 %* | *25* | *< 0,001* |
| | 72 | 224 % | 20 | < 0,001 |
| | 71 | 247 % | 20 | < 0,001 |
| BV9 4 x $10^4$cel. par puits | 70 | 129 % | 10 | < 0,001 |
| | 88 | 130 % | 25 | < 0,05 |
| | 68 | 142 % | 10 | < 0,001 |
| | 69 | 153 % | 50 | < 0,001 |
| | *50* | *170 %* | *12,5* | *< 0,001* |
| | 89 | 177 % | 25 | < 0,001 |
| | 49 | 220 % | 12,5 | < 0,001 |
| | 25 | 228 % | 10 | < 0,001 |
| | 26 | 278 % | 25 | < 0,001 |

La valeur médiane du taux optimal de facilitation de la croissance cellulaire est de *136 %* pour les cellules DHD K12 et est de *170 %* pour les cellules BV9.

G A S T O P S I N E - (AMOGASTRINE)

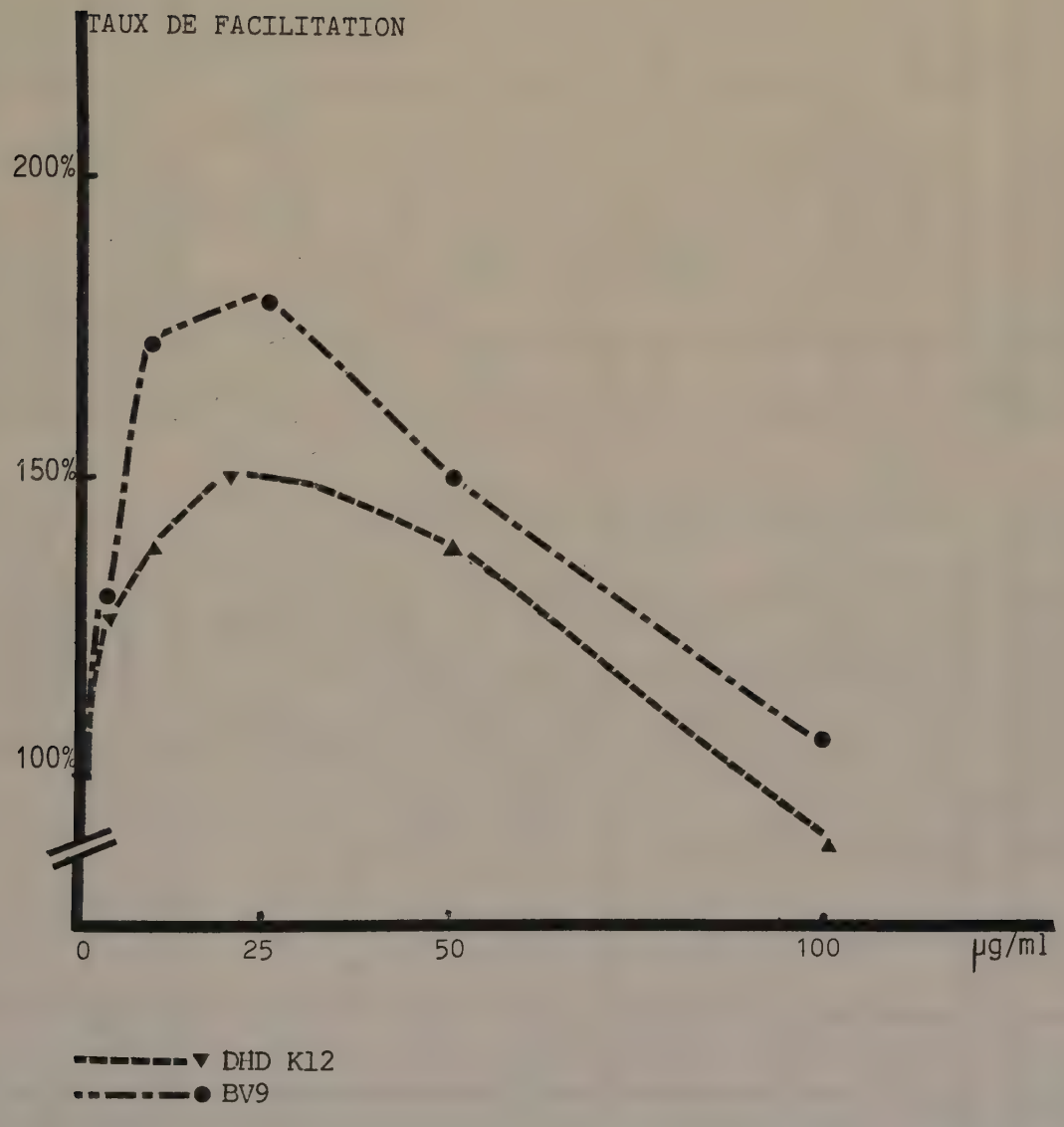



FIGURE IV

# TABLEAU X - *GASTOPSINE (Amogastrine, Nihon en µg/ml)*

Association Gastopsine/Glucagon

LIGNEE DHD K12

PLAQUE N° 71 DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | Gastopsine | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham | 0 / 20 | 5 / 0 | 5 / 20 | 10 / 0 | 10 / 20 | 20 / 0 | 20 / 20 | 50 / 0 | 50 / 20 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | GLU 12 |
| A | 340 | 63 | 107 | 107 | 130 | 131 | 142 | 122 | 161 | 96 | 196 |
| B | 351 | 41 | 124 | 63 | 99 | 82 | 117 | 130 | 108 | 101 | 177 |
| C | 410 | 52 | 124 | 71 | 115 | 99 | 113 | 113 | 153 | 162 | 186 |
| D | 375 | 57 | 127 | 74 | 125 | 147 | 125 | 113 | 140 | 144 | 157 |
| E | 419 | 56 | 130 | 67 | 108 | 92 | 88 | 132 | 129 | 96 | 152 |
| F | 274 | 54 | 80 | 79 | 145 | 112 | 105 | 139 | 130 | 96 | 144 |
| J | 443 | 39 | 86 | 86 | 117 | 110 | 83 | 124 | 166 | 92 | 86 |
| H | 273 | 47 | 94 | 80 | 123 | 104 | 99 | 134 | 105 | 70 | 124 |
| $\overline{X}$ | 361 | 51 | 109 | 78 | 120 | 110 | 109 | 126 | 137 | 107 | 153 |
| SD | 64 | 8 | 20 | 14 | 14 | 21 | 20 | 10 | 23 | 30 | 36 |

| COMPARAISON | 4 / 3 | 5 / 3 | 6 / 3 | 7 / 3 | 8 / 3 | 9 / 3 | 10 / 3 | 11 / 3 | 12 / 3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | *213%* | 153% | *235%* | 216% | *214%* | 247% | *269%* | 210% | *300%* |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |

LIGNEE BV9

PLAQUE N° 26 DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| 0 | M.C. | Ham | | | | | 5 | 10 | 25 | 50 | Ham |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 451 | 101 | | | | | 164 | 250 | 254 | 202 | 117 |
| B | 524 | 98 | | | | | 194 | 255 | 294 | 230 | 113 |
| C | 515 | 72 | | | | | 129 | 229 | 304 | 196 | 103 |
| D | 561 | 81 | | | | | 134 | 220 | 267 | 187 | 91 |
| E | 487 | 91 | | | | | 163 | 213 | 230 | 156 | 99 |
| F | 485 | 65 | | | | | 124 | 209 | 235 | 242 | 67 |
| J | 444 | 90 | | | | | 153 | 232 | 218 | 184 | 77 |
| H | 444 | 100 | | | | | 104 | 105 | 133 | 89 | 115 |
| $\overline{X}$ | 489 | 87 | | | | | 145 | 214 | 242 | 186 | 98 |
| SD | 42 | 13 | | | | | 28 | 47 | 87 | 47 | 18 |

| COMPARAISON | | | | | 8 / 3 | 9 / 3 | 10 / 3 | 11 / 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | | | | | 167% | 246% | 278% | 214% | |
| P < | | | | | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | |

Au niveau des deux lignées, on observe une toxicité de la Gastopsine pour des concentrations supérieures à 100 µg/ml.
Ce peptide semble être plus actif au niveau des cellules BV9.

5- Le N-t-Amyloxycarbonyl-L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$, *Sigma*.

5.1 Concernant la lignée DHD K12 :

- Le tableau XI montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 3/3 expériences avec $p < 0,001$.
La valeur médiane de ce taux est de 219 % avec pour extrèmes 184 et 358 %.
Au cours de ces 3 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de croissance optimale est de 25 µg/ml.

- La courbe figure V, établie à partir de 3 plaques, présente son sommet vers 254 % pour une concentration de 25 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 93 - tableau III, le taux optimal est de 358 % pour une concentration de 25 µg/ml.

5.2 Concernant la lignée BV9 :

- Le tableau XI montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 2/3 expériences avec $p < 0,001$.
La valeur médiane de ce taux est de 174 % avec pour extrèmes 130 et 174 %.
Au cours de 2 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de croissance optimale se situe entre 12,5 et 25 µg/ml.

- La courbe figure V, établie à partir de 3 plaques, présente son sommet vers 157 % pour une concentration de 12,5 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 88 - tableau XII, le taux optimal est de 174 % pour une concentration de 12,5 µg/ml.

Au niveau des deux lignées, ce produit n'a pas été testé au-delà de 50 µg/ml. Les courbes figure V, sont en faveur d'une activité supérieure de ce peptide sur la lignée DHD K12 en comparaison avec son homologue, la Gastopsine. Nous avons testé côte à côte la Gastopsine et ce peptide, plaques N° 88 et 97 - tableau XII, mais les résultats préliminaires obtenus ne nous ont pas permis de conclure.

TABLEAU XI

*N-t-Amyloxycarbonyl-L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$, Sigma.*

| Lignée cellulaire | N ° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 $10^4$cel. par puits | 95<br>*97*<br>93 | 184 %<br>*219 %*<br>358 % | 25<br>*25*<br>25 | < 0,001<br>*< 0,001*<br>< 0,001 |
| BV9 4 x $10^4$cel. par puits | 91<br>*90*<br>88 | 130 %<br>*174 %*<br>174 % | 25<br>*25*<br>12,5 | < 0,01<br>*< 0,001*<br>< 0,001 |

La valeur médiane du taux optimal de facilitation de la croissance cellulaire est de *219 %* pour les cellules DHD K12 et se situe vers *174 %* pour les cellules BV9.

N-t-Amyloxycarbonyl-L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$

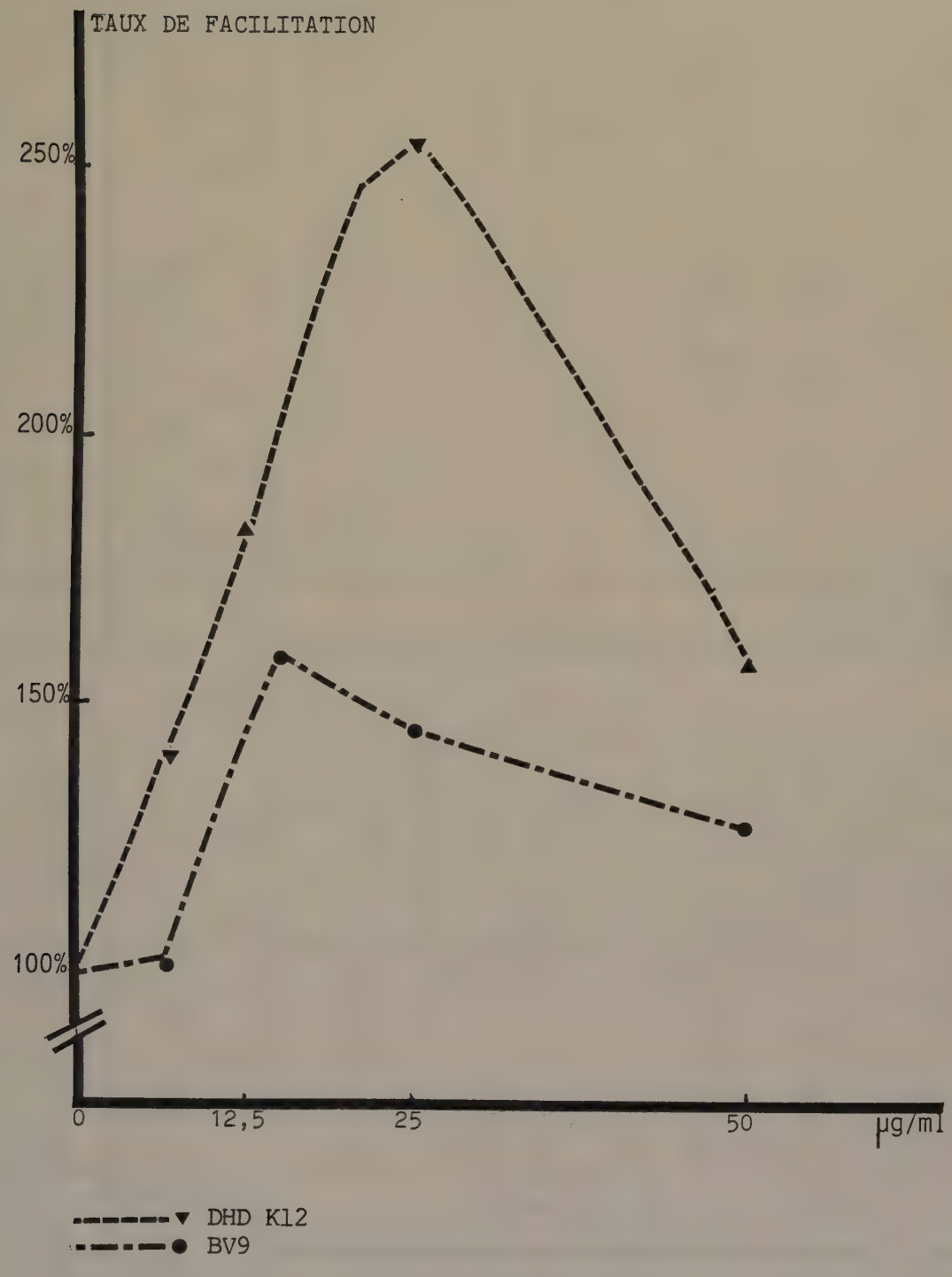



FIGURE V

## TABLEAU XII - *COMPARAISON AMOGASTRINE - Nihon et AMOGASTRINE - Sigma* (en µg/ml)

LIGNEE DHD.K12

PLAQUE N° 97 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | Amogastrine-Nihon | | | | Amogastrine-Sigma | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | Ham + DMSO |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 426 | 127 | 182 | 160 | 207 | 207 | 142 | 218 | 216 | 225 | 132 |
| B | 452 | 126 | 160 | 213 | 176 | 127 | 125 | 152 | 195 | 166 | 90 |
| C | 388 | 158 | 160 | 232 | 167 | 177 | 152 | 190 | 227 | 182 | 115 |
| D | 356 | 137 | 168 | 210 | 153 | 128 | 136 | 168 | 228 | 161 | 109 |
| E | 356 | 118 | 157 | 204 | 163 | 127 | 122 | 177 | 245 | 159 | 106 |
| F | 351 | 143 | 138 | 193 | 174 | 137 | 129 | 153 | 214 | 139 | 81 |
| J | 369 | 119 | 130 | 174 | 139 | 123 | 129 | 171 | 224 | 132 | 98 |
| H | 338 | 106 | 132 | 186 | 155 | 125 | 113 | 145 | 215 | 126 | 77 |
| $\bar{X}$ | 380 | 129 | 153 | 197 | 167 | 144 | 131 | 178 | 221 | 161 | 101 |
| SD | 40 | 16 | 18 | 23 | 20 | 31 | 12 | 24 | 14 | 32 | 18 |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/12 | 9/12 | 10/12 | 11/12 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 119% | 153% | 130% | 112% | 130% | 176% | 219% | 159% | |
| P < | 0,05 | 0,001 | 0,01 | NS | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | |

LIGNEE BV9

PLAQUE N° 88 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | Amogastrine-Nihon | | | | Amogastrine-Sigma | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham+ DMSO | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 238 | 81 | 102 | 114 | 124 | 81 | 111 | 142 | 125 | 119 | |
| B | 256 | 86 | 76 | 68 | 93 | 71 | 67 | 114 | 94 | 85 | |
| C | 205 | 45 | 62 | 60 | 72 | 44 | 50 | 102 | 55 | 76 | |
| D | 219 | 51 | 48 | 53 | 52 | 32 | 43 | 88 | 52 | 59 | |
| E | 223 | 52 | 58 | 59 | 68 | 41 | 47 | 120 | 64 | 77 | |
| F | 227 | 42 | 42 | 53 | 56 | 40 | 47 | 76 | 55 | 63 | |
| J | 215 | 45 | 51 | 69 | 56 | 28 | 40 | 53 | 51 | 71 | |
| H | | | | | | | | | | | |
| $\bar{X}$ | 226 | 57 | 63 | 68 | 74 | 48 | 58 | 99 | 71 | 79 | |
| SD | 17 | 18 | 21 | 21 | 26 | 20 | 25 | 30 | 28 | 20 | |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/3 | 9/3 | 10/3 | 11/3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 111% | 119% | 130% | 84% | 102% | 174% | 125% | 139% | |
| P < | NS | NS | 0,05 | 0,05 | NS | 0,005 | 0,05 | 0,01 | |

6- LE N-t-Butyloxycarbonyl-L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$, *Sigma*.

6.1 Concernant la lignée DHD K12 :

- Le tableau XIII montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 5/8 expériences avec $p < 0,001$.
La valeur médiane de ce taux se situe vers 167 % avec pour extrèmes 125 et 206 %.
Au cours de ces 5 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de croissance optimale se situe entre 25 et 50 µg/ml.

- La courbe figure VI, établie à partir de 8 plaques, présente son sommet vers 160 % pour une concentration de 25 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 86 - tableau XIV, le taux optimal est de 206 % pour une concentration de 50 µg/ml.

6.2 Concernant la lignée BV9 :

- Le tableau XIII montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 4/6 expériences avec $p < 0,001$.
La valeur médiane de ce taux se situe vers 123 % avec pour extrèmes 113 et 138 %.
Au cours de ces 4 expériences significatives, la concentration hormonale donnant le taux de croissance optimale est de 25 µg/ml.

- La courbe figure VI, établie à partir de 6 plaques, présente son sommet vers 124 % pour une concentration de 25 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 81 - tableau XIV, le taux optimal est de 138 % pour une concentration de 25µg/ml.

Au niveau des deux lignées, ce peptide est toxique au-delà de 100 µg/ml mais semble plus actif sur la croissance des cellules DHD K12.

Ce peptide est comparé au Peptavlon car il serait son homologue à la différence qu'il ne possède pas *"β-Alanyl"* entre le groupe Carboxyl et la séquence tetrapeptidique terminale. Sur une même plaque nous avons mis côte à côte ces deux produits et pour une concentration de 25 µg/ml, nous obtenons :

.Plaque N° 81 sur BV9 tableau XIV un taux de 125 % contre 109 % avec le Peptavlon.

.Plaque N° 73 sur DHD tableau XX un taux de 151 % contre 107 % avec le Peptavlon.

TABLEAU XIII

*N-t-Butyloxycarbonyl-L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$, Sigma.*

| Lignée cellulaire | N ° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 $10^4$cel. par puits | 74 | 125 % | 50 | < 0,05 |
| | 75 | 155 % | 50 | < 0,01 |
| | 76 | 155 % | 50 | < 0,001 |
| | *73* | *162 %* | *50* | *< 0,001* |
| | *85* | *172 %* | *25* | *< 0,001* |
| | 87 | 186 % | 25 | < 0,01 |
| | 83 | 203 % | 25 | < 0,001 |
| | 86 | 206 % | 50 | < 0,001 |
| BV9 4 x $10^4$cel. par puits | 80 | 113 % | 25 | < 0,001 |
| | 78 | 115 % | 25 | < 0,01 |
| | *77* | *121 %* | *25* | *< 0,001* |
| | *82* | *126 %* | *25* | *< 0,001* |
| | 79 | 129 % | 25 | < 0,01 |
| | 81 | 138 % | 25 | < 0,001 |

La valeur médiane du taux optimal de facilitation de la croissance cellulaire se situe vers *167 %* pour les cellules DHD K12 et vers *123 %* pour les cellules BV9.

N-t-Butyloxycarbonyl-L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$

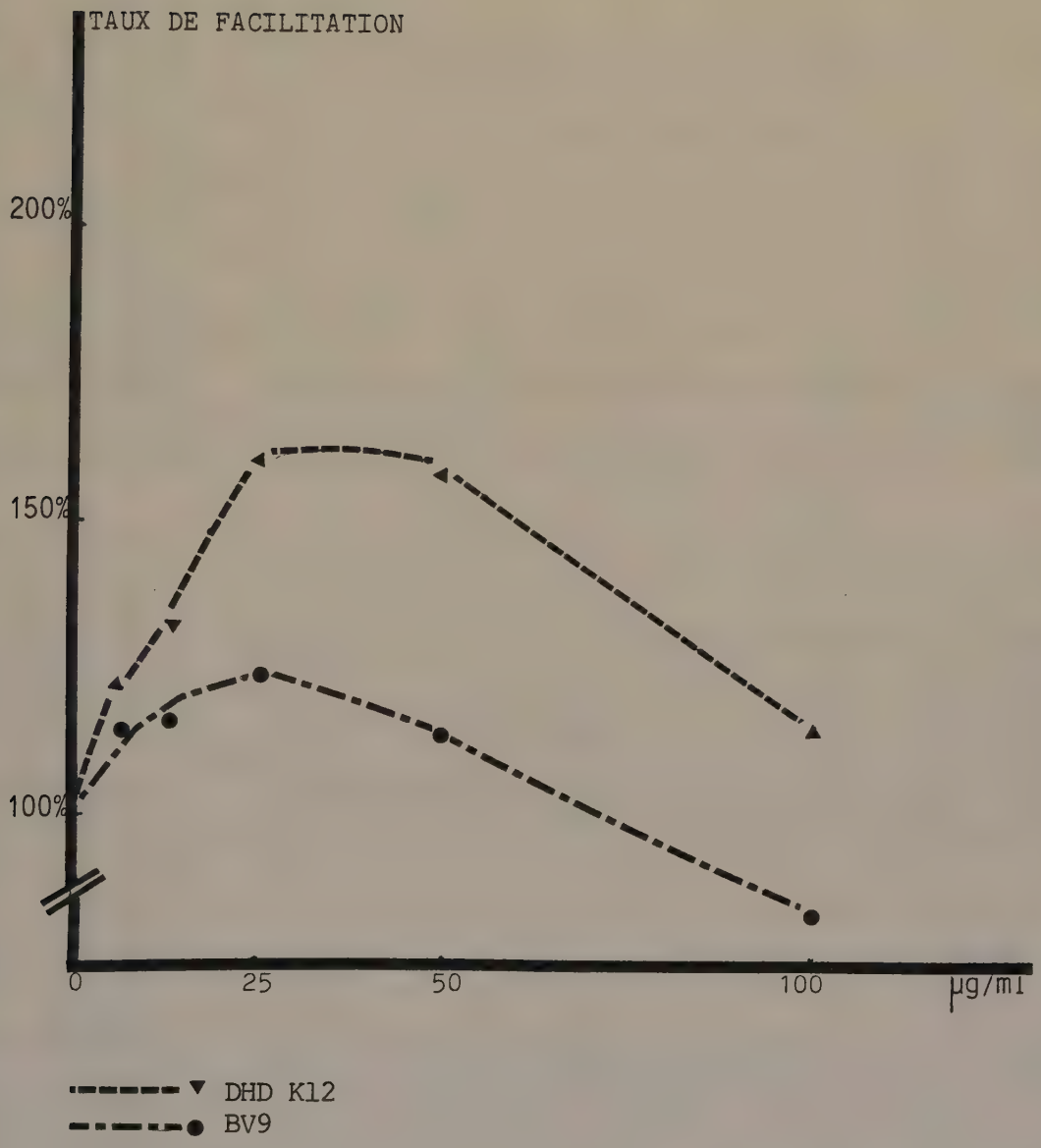



FIGURE VI

## TABLEAU XIV - *N-tButyloxycarbonylTrypMethAspPheNH$_2$* (en µg/ml)

### LIGNEE DHD K12

PLAQUE N° 86 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | TrypMetAspPheNH2 | | | | ButylCPeptide | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham + DMSO | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | Ham+ DMSO |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 982 | 238 | 378 | 422 | 386 | 373 | 271 | 335 | 479 | 465 | 251 |
| B | 1031 | 231 | 395 | 434 | 372 | 385 | 264 | 351 | 432 | 446 | 270 |
| C | 1071 | 222 | 394 | 405 | 391 | 384 | 268 | 327 | 393 | 534 | 227 |
| D | 944 | 225 | 395 | 398 | 422 | 364 | 237 | 383 | 475 | 469 | 260 |
| E | 986 | 224 | 445 | 399 | 344 | 315 | 261 | 360 | 409 | 458 | 248 |
| F | 938 | 300 | 364 | 396 | 338 | 381 | 248 | 408 | 451 | 518 | 196 |
| J | 956 | 223 | 328 | 332 | 377 | 328 | 275 | 336 | 503 | 532 | 194 |
| H | 714 | 210 | 368 | 277 | 294 | 296 | 232 | 335 | 434 | 357 | 148 |
| $\bar{X}$ | 953 | 233 | 383 | 383 | 366 | 353 | 257 | 354 | 447 | 472 | 224 |
| SD | 106 | 29 | 34 | 52 | 39 | 35 | 16 | 28 | 37 | 58 | 42 |

| COMPARAISON | 4 / 3+12/2 | 5 / 3+12/2 | 6 / 3+12/2 | 7 / 3+12/2 | 8 / 3+12/2 | 9 / 3+12/2 | 10 / 3+12/2 | 11 / 3+12/2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 167% | 167% | 160% | 154% | 112% | 155% | 195% | 206% | |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | NS | 0,001 | 0,001 | 0,001 | |

### LIGNE BV9

PLAQUE N° 81 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | TrypMetAspPheNH2 | | | ButylCPeptide | | | Peptavlon | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham+ DMSO | 25 | 50 | 100 | 25 | 50 | 100 | 12,5 + DMSO | 25 | Ham+ DMSO |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 897 | 644 | 810 | 681 | 601 | 936 | 797 | 613 | 733 | 711 | 511 |
| B | 930 | 599 | 659 | 666 | 610 | 780 | 695 | 505 | 632 | 628 | 490 |
| C | 986 | 701 | 680 | 691 | 679 | 761 | 732 | 562 | 651 | 668 | 469 |
| D | 929 | 686 | 761 | 727 | 634 | 751 | 728 | 452 | 755 | 593 | 515 |
| E | 894 | 735 | 740 | 740 | 569 | 821 | 747 | 515 | 703 | 649 | 521 |
| F | 840 | 725 | 772 | 732 | 708 | 826 | 706 | 465 | 661 | 621 | 495 |
| J | 881 | 681 | 714 | 719 | 763 | 772 | 799 | 406 | 720 | 676 | 525 |
| H | 865 | 650 | 721 | 667 | 648 | 867 | 714 | 407 | 647 | 658 | 497 |
| $\bar{X}$ | 903 | 678 | 732 | 703 | 652 | 814 | 740 | 491 | 688 | 642 | 503 |
| SD | 45 | 45 | 49 | 30 | 63 | 63 | 39 | 73 | 46 | 29 | 19 |

| COMPARAISON | 4 / 3+12/2 | 5 / 3+12/2 | 6 / 3+12/2 | 7 / 3+12/2 | 8 / 3+12/2 | 9 / 3+12/2 | 10 / 3+12/2 | 11 / 3+12/2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 124% | 119% | 110% | 138% | 125% | 83% | 116% | 109% | |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | NS | 0,001 | 0,001 | |

## 7- LES AUTRES PEPTIDES

### 7.1 LA L-Phenylalaninamide

- Le tableau XV ne montre aucune augmentation significative de la croissance cellulaire dans toutes les expériences réalisées et ceci au niveau des deux lignées.

- Les courbes figures VII et les plaques N° 54 et 57 - tableau XVI confirment l'inactivité de ce peptide et qui présente même une toxicité à partir de 50 µg/ml.

### 7.2 LA L-Asp-L-Phenylalaninamide

- Le tableau XVII ne montre également aucune augmentation significative de la croissance cellulaire dans toutes les expériences réalisées et ceci au niveau des deux lignées.

- Les courbes figures VII et les plaques N° 54 et 57 - tableau XVI confirment l'inactivité de ce peptide.

### 7.3 LA L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$

#### 7.3.1 Concernant la lignée DHD K12

- Le tableau XVIII montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 7/8 expériences avec $p < 0,001$. La valeur médiane de ce taux se situe vers 180 % avec pour extrèmes 160 et 268 %.

Au cours de ces 7 expériences significatives, la concentration du peptide donnant le taux de croissance optimale se situe entre 12,5 et 50 µg/ml.

- La courbe figure IX, établie à partir de 8 plaques, présente son sommet vers 200 % pour une concentration de 6,5 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 84 - tableau XIX, le taux optimal est de 268 % pour une concentration de 12,5 µg/ml.

#### 7.3.2 Concernant la lignée BV9

- Le tableau XVIII montre une augmentation significative du taux optimal de facilitation dans 5/6 expériences avec $p < 0,001$. La valeur médiane de ce taux se situe vers 126 % avec pour extrèmes 113 et 130 %.

TABLEAU XV

*L-Phe-$NH_2$, Sigma*

| Lignée cellulaire | N ° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 4 x $10^4$cel. par puits | 53 | 82 % | 12,5 | NS |
| | *54* | *93 %* | *25* | *NS* |
| | *58* | *102 %* | *50* | *< 0,05* |
| | 59 | 104 % | 25 | NS |
| BV9 4 x $10^4$cel. par puits | 60 | 90 % | 6,25 | NS |
| | 61 | 90 % | 6,25 | <0,01 |
| | *55* | *99 %* | *12,5* | *NS* |
| | 56 | 101 % | 50 | NS |
| | 57 | 103 % | 12,5 | NS |

La valeur médiane du taux optimal de facilitation de la croissance cellulaire obtenue n'est pas significative au niveau des deux lignées.
Ce produit est inactif.

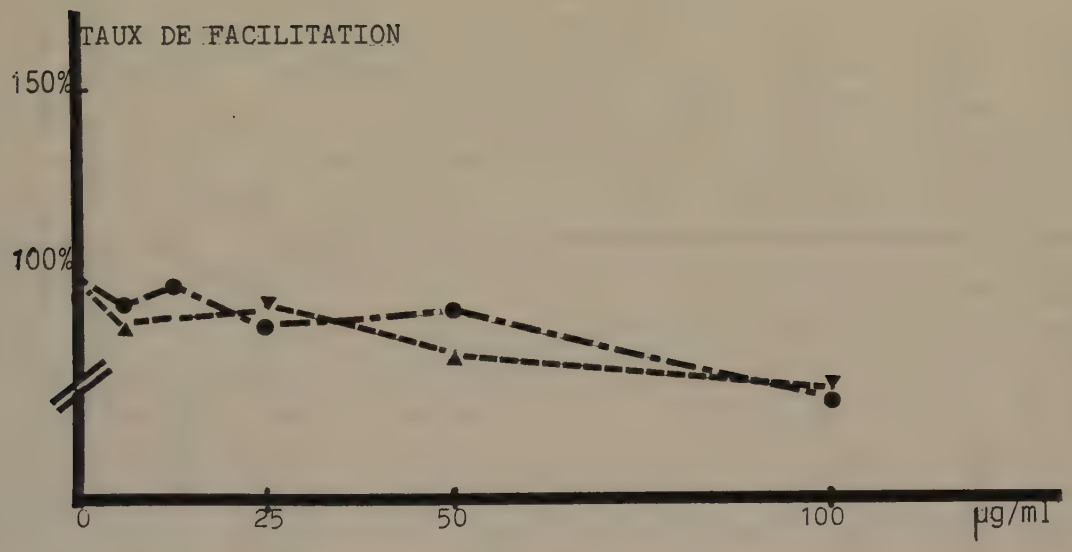
TABLEAU XVII

*L-Asp-L-Phe-$NH_2$, Sigma*

| Lignée cellulaire | N° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 $10^4$cel. par puits | 54 | 106 % | 50 | NS |
| | *59* | *109 %* | *12,5* | *NS* |
| | *58* | *112 %* | *12,5* | *NS* |
| | 53 | 120 % | 50 | NS |
| BV9 $4 \times 10^4$cel. par puits | 61 | 90 % | 6,25 | < 0,01 |
| | 60 | 91 % | 6,25 | < 0,01 |
| | *56* | *110 %* | *12,5* | *NS* |
| | 55 | 111 % | 25 | NS |
| | 57 | 114 % | 12,5 | NS |

La valeur médiane du taux optimal de facilitation de la croissance cellulaire obtenue n'est pas significative au niveau des deux lignées.
Ce produit est inactif.

L-Phe-$NH_2$




L-Asp-L-Phe-$NH_2$

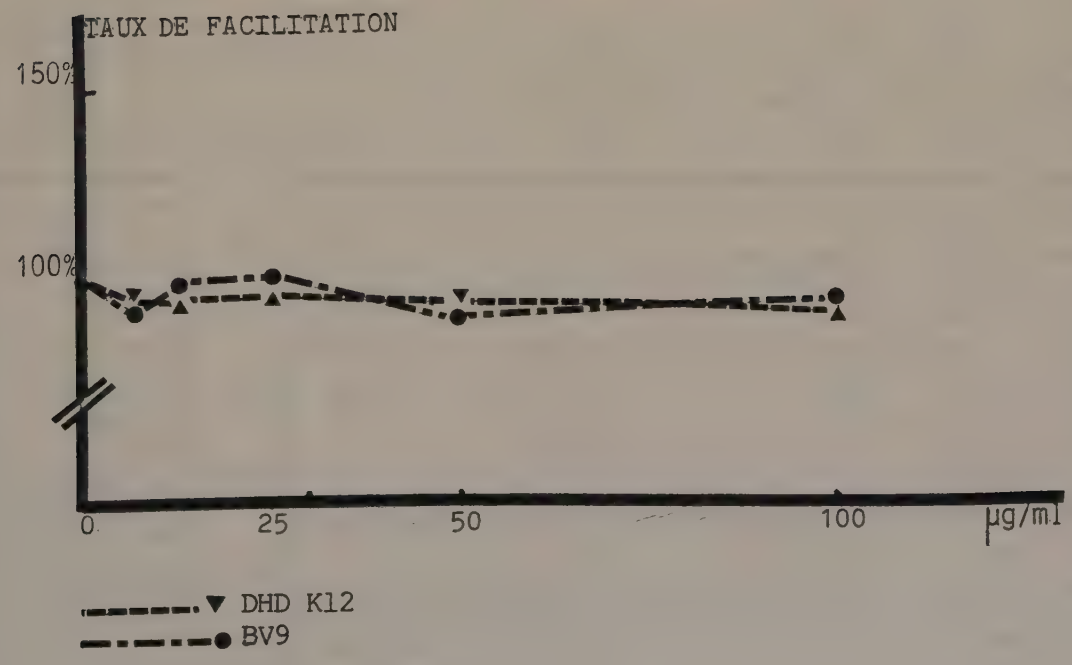



FIGURE VII

## TABLEAU XVI - *L-PheNH$_2$* - *L-Asp-L-PheNH$_2$* , *Sigma (en µg/ml)*

LIGNEE DHD K12

PLAQUE N° 54 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | L-PheNH2 | | | | L-Asp-L-Phe-NH2 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | Ham |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | 800 | 103 | 81 | 48 | 45 | 42 | 77 | 89 | 84 | 81 | 87 |
| B | | 866 | 117 | 86 | 71 | 66 | 85 | 90 | 93 | 106 | 88 | 135 |
| C | | 893 | 121 | 87 | 109 | 81 | 124 | 88 | 127 | 129 | 94 | 105 |
| D | | 921 | 143 | 109 | 102 | 120 | 88 | 106 | 106 | 110 | 130 | 109 |
| E | | 956 | 135 | 110 | 223 | 65 | 57 | 129 | 160 | 102 | 105 | 87 |
| F | | 897 | 93 | 134 | 88 | 68 | 57 | 76 | 87 | 115 | 80 | 93 |
| J | | 933 | 124 | 111 | 155 | 101 | 120 | 127 | 154 | 164 | 142 | 128 |
| H | | 944 | 141 | 124 | 108 | 125 | 65 | 125 | 147 | 225 | 128 | 229 |
| $\overline{X}$ | | 901 | 122 | 105 | 113 | 84 | 80 | 102 | 120 | 129 | 106 | 122 |
| SD | | 50 | 18 | 19 | 54 | 29 | 30 | 22 | 31 | 45 | 24 | 47 |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/3 | 9/3 | 10/3 | 11/3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 86% | 93% | 69% | 66% | 84% | 98% | 106% | 87% | |
| P < | NS | NS | 0,001 | 0,01 | 0,01 | NS | NS | 0,05 | |

LIGNEE BV9

PLAQUE N° 57 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | L-PheNH2 | | | | L-Asp-L-Phe-NH2 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | Ham |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | 841 | 263 | 234 | 148 | 118 | 100 | 211 | 264 | 248 | 193 | 301 |
| B | | 1237 | 284 | 244 | 181 | 198 | 110 | 208 | 247 | 219 | 221 | 366 |
| C | | 1213 | 267 | 325 | 201 | 155 | 103 | 200 | 249 | 201 | 196 | 318 |
| D | | 1107 | 245 | 340 | 241 | 191 | 104 | 234 | 273 | 228 | 250 | 260 |
| E | | 1066 | 289 | 296 | 233 | 262 | 125 | 377 | 425 | 275 | 220 | 269 |
| F | | 1029 | 241 | 223 | 272 | 298 | 171 | 318 | 391 | 272 | 251 | 379 |
| J | | 1009 | 286 | 224 | 239 | 191 | 168 | 255 | 430 | 243 | 174 | 271 |
| H | | 1190 | 287 | 336 | 191 | 195 | 168 | 213 | 188 | 191 | 188 | 277 |
| $\overline{X}$ | | 1087 | 270 | 278 | 213 | 201 | 131 | 252 | 308 | 235 | 212 | 305 |
| SD | | 131 | 19 | 52 | 40 | 57 | 32 | 63 | 93 | 31 | 29 | 46 |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/3 | 9/3 | 10/3 | 11/3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 103% | 79% | 74% | 49% | 93% | 114% | 87% | 79% | |
| P < | NS | 0,05 | 0,05 | 0,001 | NS | NS | 0,05 | 0,01 | |

TABLEAU XVIII

*L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$, Sigma.*

| Lignée cellulaire | N ° Plaque | Taux optimal de facilitation | Concentration du peptide en µg/ml | p |
|---|---|---|---|---|
| DHD K12 $10^4$cel. par puits | 74 | 149 % | 12,5 | NS |
| | 73 | 160 % | 50 | < 0,001 |
| | 86 | 167 % | 12,5 | < 0,001 |
| | *75* | *175 %* | *25* | *< 0,001* |
| | *85* | *186 %* | *12,5* | *< 0,001* |
| | 76 | 189 % | 50 | < 0,001 |
| | 87 | 200 % | 12,5 | < 0,001 |
| | 84 | 268 % | 12,5 | < 0,001 |
| BV9 4 X $10^4$cel. par puits | 80 | 113 % | 50 | < 0,05 |
| | 82 | 119 % | 6,5 | < 0,001 |
| | *81* | *124 %* | *25* | *< 0,001* |
| | *78* | *127 %* | *25* | *< 0,001* |
| | 77 | 128 % | 25 | < 0,001 |
| | 79 | 130 % | 12,5 | < 0,001 |

La valeur médiane du taux optimal de facilitation de la croissance cellulaire se situe vers *180 %* pour les cellules DHD K12 et vers *126 %* pour les cellules BV9.

L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$

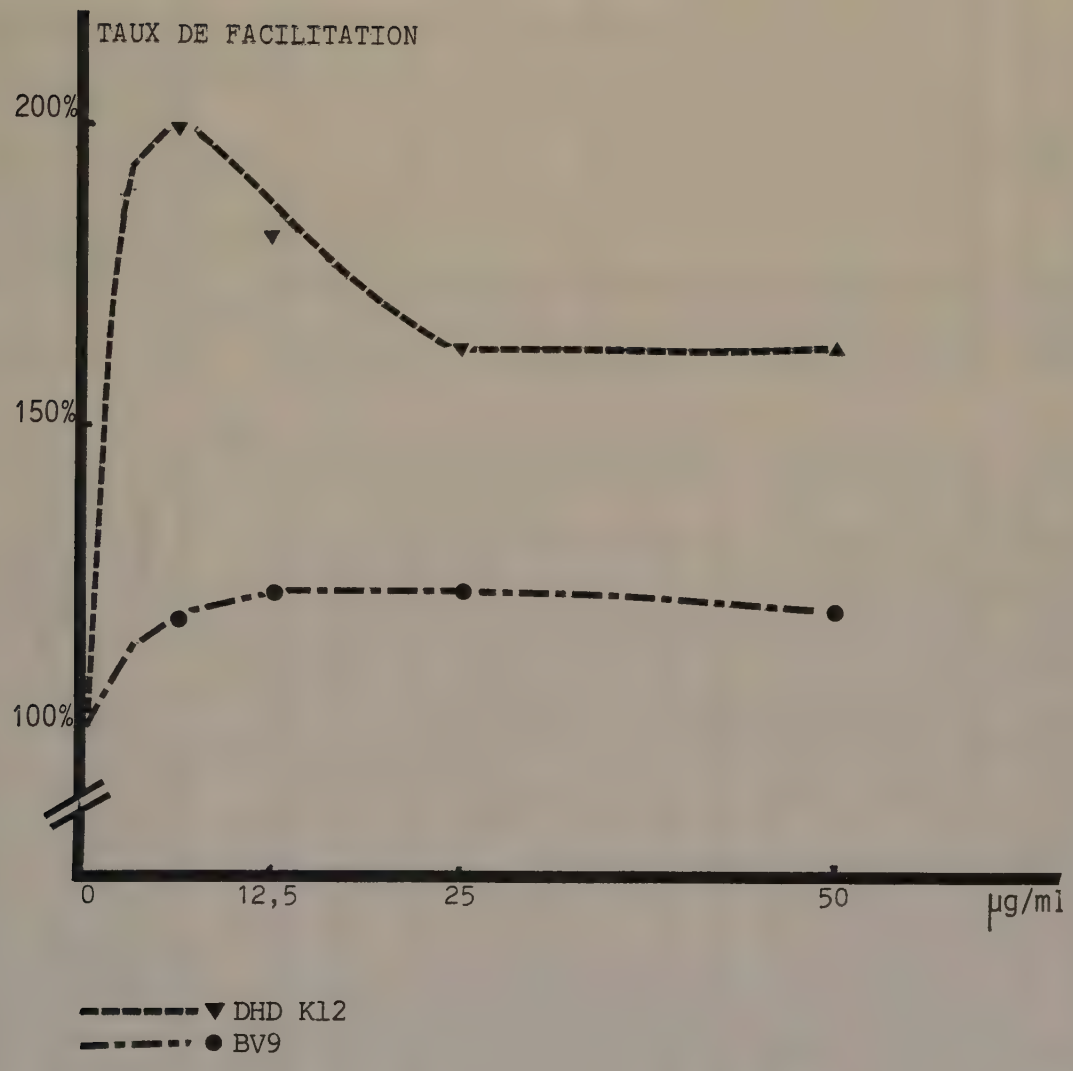



FIGURE IX

# TABLEAU XIX - *TrypMethAspPheNH$_2$* (en µg/ml)

## LIGNEE DHD K12

PLAQUE N° 84

Ddensites optiques x $10^3$

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | M.C. | Ham+ DMSO | TrypMethAspPheNH2 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | Peptavlon 6,25 + | 12,5 DMSO | 25 | Ham+ DMSO |
| A | | | 537 | 63 | 284 | 207 | 182 | 205 | 198 | 120 | 170 | 121 | 30 |
| B | | | 675 | 107 | 279 | 250 | 271 | 285 | 231 | 164 | 158 | 199 | 120 |
| C | | | 624 | 108 | 248 | 275 | 263 | 248 | 228 | 134 | 135 | 157 | 102 |
| D | | | 600 | 134 | 252 | 288 | 244 | 253 | 240 | 179 | 164 | 173 | 105 |
| E | | | 605 | 107 | 255 | 278 | 242 | 230 | 223 | 147 | 148 | 170 | 101 |
| F | | | 642 | 100 | 245 | 257 | 256 | 268 | 266 | 188 | 185 | 161 | 92 |
| J | | | 608 | 118 | 215 | 289 | 226 | 292 | 206 | 183 | 156 | 174 | 102 |
| H | | | 606 | 91 | 256 | 239 | 214 | 233 | 165 | 119 | 111 | 125 | 60 |
| $\overline{X}$ | | | 612 | 104 | 254 | 260 | 237 | 252 | 220 | 154 | 153 | 160 | 89 |
| SD | | | 39 | 21 | 21 | 28 | 29 | 29 | 30 | 28 | 23 | 26 | 29 |

| COMPARAISON | 4 / 3+12/2 | 5 / 3+12/2 | 6 / 3+12/2 | 7 / 3+12/2 | 8 / 3+12/2 | 9 / 3+12/2 | 10 / 3+12/2 | 11 / 3+12/2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 262% | 268% | 244% | 260% | 227% | 159% | 158% | 165% | |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,01 | 0,001 | |

## LIGNEE BV9

PLAQUE N° 79

DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | M.C. | Ham | Ham+ DMSO | TrypMethAspPheNH2 ButylCPept. 12,5 | 25 | 50 | 12,5 | 25 | 50 | Peptavlon 25 + DMSO | 25 |
| A | | | 988 | 526 | 545 | 754 | 727 | 735 | 621 | 895 | 756 | 609 | 670 |
| B | | | 1090 | 503 | 526 | 741 | 750 | 725 | 672 | 761 | 748 | 552 | 567 |
| C | | | 1041 | 521 | 601 | 711 | 722 | 730 | 657 | 697 | 681 | 557 | 553 |
| D | | | 1001 | 514 | 573 | 721 | 708 | 745 | 712 | 726 | 737 | 579 | 593 |
| E | | | 978 | 523 | 549 | 852 | 734 | 740 | 636 | 695 | 692 | 575 | 457 |
| F | | | 879 | 476 | 560 | 641 | 694 | 705 | 643 | 740 | 599 | 539 | 459 |
| J | | | 987 | 472 | 561 | 704 | 728 | 720 | 693 | 731 | 671 | 679 | 539 |
| H | | | 1037 | 506 | 597 | 745 | 705 | 707 | 665 | 590 | 629 | 584 | 504 |
| $\overline{X}$ | | | 1001 | 505 | 564 | 734 | 721 | 726 | 662 | 729 | 689 | 584 | 543 |
| SD | | | 64 | 21 | 26 | 59 | 18 | 15 | 30 | 85 | 57 | 44 | 71 |

| COMPARAISON | | 5 / 4 | 6 / 4 | 7 / 4 | 8 / 4 | 9 / 4 | 10 / 4 | 11 / 4 | 12 / 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | | 130% | 128% | 129% | 117% | 129% | 122% | 104% | 96% |
| P < | | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,01 | 0,01 | NS | NS |

TABLEAU XX - *COMPARAISON TrypMethAspPheNH$_2$, ButyloxycarbonylTrypMethAspPheNH$_2$ et Peptavlon (en µg/ml).*

LIGNEE DHD K12

PLAQUE N° 73 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | TrypMethAspPheNH2 | | | ButylCPept. | | | Peptavlon | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | Ham | Ham+ DMSO | 12,5 | 25 | 50 | 12,5 | 25 | 50 | 12,5 | 25 | 50 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 229 | 257 | 277 | 321 | 334 | 260 | 309 | 300 | 192 | 236 | 261 |
| B | 217 | 183 | 229 | 317 | 316 | 211 | 261 | 327 | 218 | 173 | 292 |
| C | 198 | 175 | 253 | 335 | 274 | 229 | 280 | 525 | 551 | 229 | 268 |
| D | 230 | 219 | 249 | 278 | 279 | 275 | 294 | 281 | 181 | 172 | 227 |
| E | 175 | 171 | 233 | 246 | 249 | 224 | 242 | 305 | 147 | 154 | 190 |
| F | 201 | 170 | 256 | 273 | 365 | 277 | 374 | 341 | 138 | 233 | 217 |
| J | 174 | 161 | 259 | 295 | 291 | 269 | 266 | 330 | 142 | 203 | 234 |
| H | 251 | 208 | 331 | 288 | 364 | 308 | 308 | 304 | 160 | 223 | 187 |
| $\bar{X}$ | 209 | 193 | 261 | 294 | 309 | 257 | 292 | 313 | 168 | 223 | 235 |
| SD | 27 | 33 | 32 | 29 | 43 | 33 | 41 | 21 | 30 | 73 | 37 |

| COMPARAISON | 4/3 | 5/3 | 6/3 | 7/3 | 8/3 | 9/3 | 10/2 | 11/2 | 12/2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 135% | 152% | 160% | 133% | 151% | 162% | 80% | 107% | 112% |
| P < | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,01 | 0,001 | 0,001 | 0,05 | NS | NS |

LIGNEE BV9

PLAQUE N° 82 — DENSITES OPTIQUES X $10^3$

| | | | TrypMethAspPheNH2 | | | ButylCPept. | | | Peptavlon | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | M.C. | Ham+ DMSO | 6,25 | 12,5 | 25 | 6,25 | 12,5 | 25 | 6,25 + DMSO | 12,5 + DMSO | Ham+ DMSO |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 919 | 663 | 823 | 741 | 729 | 693 | 843 | 833 | 699 | 687 | 674 |
| B | 887 | 573 | 766 | 839 | 793 | 733 | 842 | 875 | 674 | 678 | 709 |
| C | 924 | 641 | 795 | 715 | 802 | 791 | 777 | 859 | 691 | 657 | 687 |
| D | 1001 | 647 | 815 | 757 | 726 | 760 | 827 | 822 | 651 | 689 | 711 |
| E | 925 | 720 | 790 | 804 | 811 | 768 | 851 | 856 | 606 | 612 | 648 |
| F | 1148 | 763 | 742 | 835 | 786 | 778 | 820 | 885 | 672 | 675 | 602 |
| J | 1000 | 670 | 880 | 830 | 833 | 803 | 848 | 839 | 546 | 617 | 657 |
| H | 935 | 712 | 832 | 770 | 808 | 812 | 789 | 812 | 670 | 652 | 705 |
| $\bar{X}$ | 967 | 674 | 805 | 786 | 786 | 767 | 825 | 848 | 651 | 658 | 674 |
| SD | 83 | 58 | 42 | 47 | 39 | 39 | 28 | 26 | 51 | 30 | 38 |

| COMPARAISON | 4/12 | 5/12 | 6/12 | 7/12 | 8/12 | 9/12 | 10/12 | 11/12 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TAUX DE FACILITATION | 119% | 117% | 117% | 114% | 122% | 126% | 97% | 98% | |
| P < | 0,001 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,001 | 0,001 | NS | NS | |

Au cours de ces 5 expériences significatives, la concentration du peptide donnant le taux de croissance optimale est de 25 µg/ml.

- La courbe figure IX, établie à partir de 6 plaques, présente un plateau vers 120 % pour des concentrations comprises entre 12,5 et 50 µg/ml.

- Dans l'expérience la plus favorable, plaque N° 79 - tableau XIX, quelque soient les concentrations utilisées de 12,5 à 50 µg/ml, nous obtenons un taux moyen de 128 %.

Au niveau des deux lignées, il est très intéressant de constater que contrairement aux deux derniers peptides étudiés plus haut, ce produit présente une activité significative sur la croissance cellulaire des deux lignées et particulièrement sur la DHD K12.

Cet analogue de la Gastrine qui ne comporte que sa séquence tetrapeptidique terminale présenterait donc une activité hormonale comparable à celle du N-t-ButyloxycarbonylTrypMethAspPheNH$_2$ comme le démontrent les tableaux XIX (Plaque N° 79) et XX.

## 8- LES HORMONES EN ASSOCIATION

Seuls l'AMOGASTRINE et le GLUCAGON ont eté étudiés en association. Chaque expérience réalisée est représentée au niveau des courbes figures X et XI.

Selon le test U de Mann et Whitney, nous obtenons les résultats suivants :

### 8.1 Concernant la lignée DHD K12 :

.Plaque N° 64

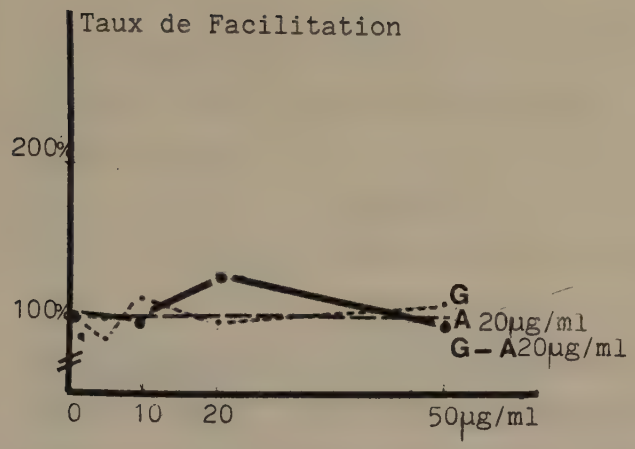
- L'Amogastrine (*Nihon.*) à la concentration de 10 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique du Glucagon testé à 20 µg/ml avec $p < 0,05$.

. Plaque N° 71 (tableau X)

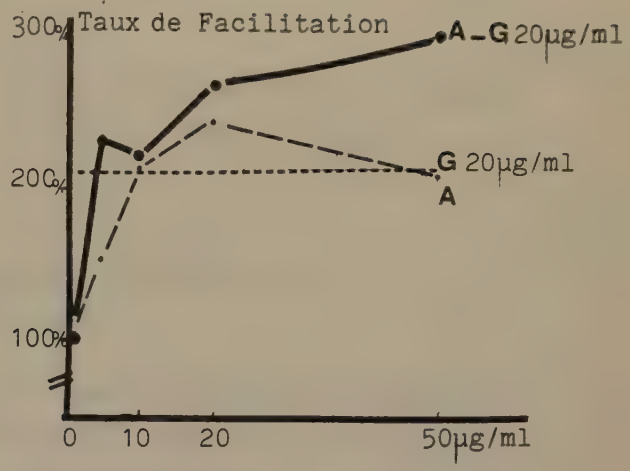
- L'Amogastrine (*Nihon.*) à la concentration de 50 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique du Glucagon testé à 20 µg/ml avec $p < 0,05$.
- Le Glucagon à la concentration de 20 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine testée à 5 µg/ml avec $p < 0,01$ et testée à 50 µg/ml avec $p < 0,05$.

LIGNÉE DHD K12

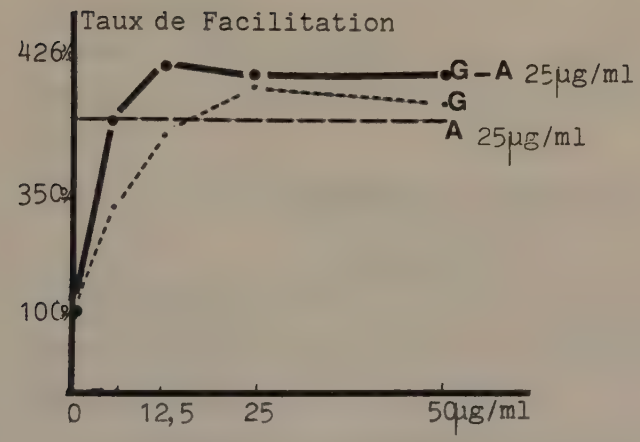
ASSOCIATION AMOGASTRINE-GLUCAGON



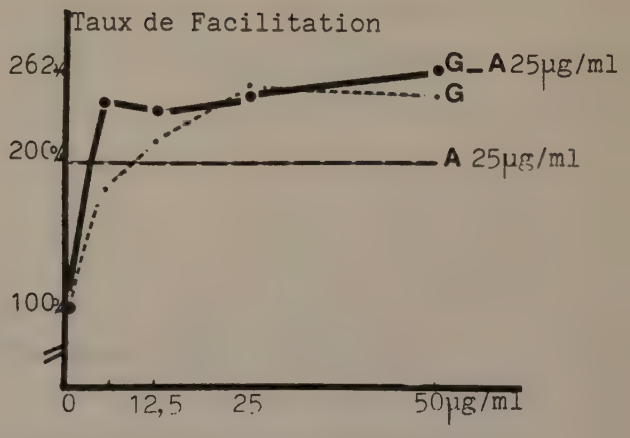

PLAQUE N° 64



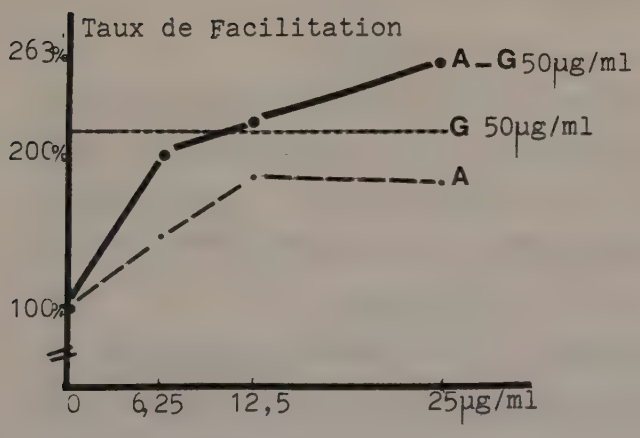

PLAQUE N° 71



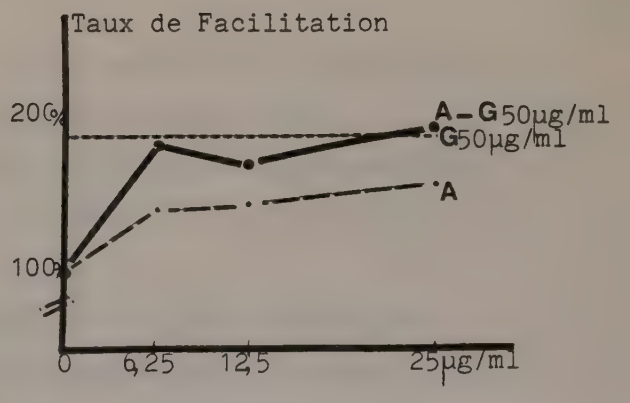

PLAQUE N° 93




PLAQUE N° 94




PLAQUE N° 95




PLAQUE N° 96

FIGURE X

——— A–G ou ——— G–A Association Amogastrine-Glucagon

---------- Glucagon

_ _ _ _ _ Amogastrine

. Plaque N° 93 (tableau III)

- Le Glucagon à la concentration de 6,25 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine (*Sigma*) testée à 25 µg/ml avec $p < 0,05$.

. Plaque N° 94

Elle ne présente aucune association synergique significative.

. Plaque N° 95

- Le Glucagon à la concentration de 50 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine (*Sigma*) testée à 6,25 µg/ml avec $p < 0,05$, testée à 12,5 µg/ml avec $p < 0,05$ et testée à 25 µg/ml avec $p < 0,05$.

. Plaque N° 96

- Le Glucagon à la concentration de 50 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine (*Nihon.*) testée à 6,25 µg/ml avec $p < 0,01$ et testée à 25 µg/ml avec $p < 0,05$.

8.2 Concernant la lignée BV9 :

. Plaque N° 49

- L'Amogastrine (*Nihon.*) à la concentration de 12,5 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique du Glucagon testé à 12,5 µg/ml avec $p < 0,05$.
- Le Glucagon à la concentration de 12,5 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine testée à 12,5 µg/ml avec $p < 0,05$.
- Le Glucagon à la concentration de 25 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine testée à 25 µg/ml avec $p < 0,05$.

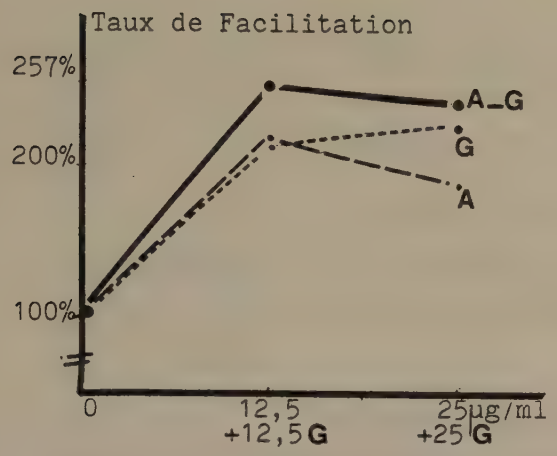
. Plaque N° 50

- Le Glucagon à la concentration de 12,5 µg/ml améliore de façon significative l'Amogastrine (*Nihon.*) testée à 12,5 µg/ml avec $p < 0,05$.
- Le Glucagon à la concentration de 25 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine testée à 25 µg/ml avec $p < 0,05$.

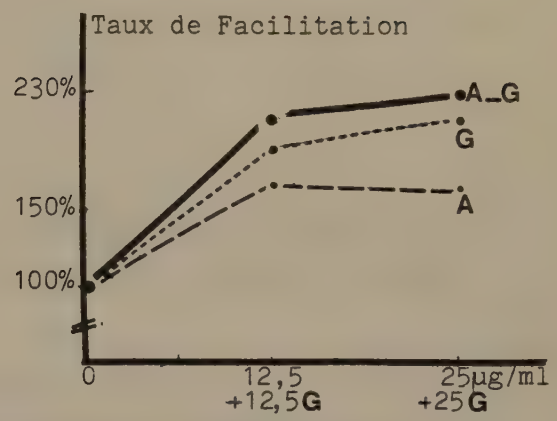
. PLaque N° 66

- L' Amogastrine (*Nihon.*) à la concentration de 20 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique du Glucagon testé à 5 µg/ml avec $p < 0,01$.

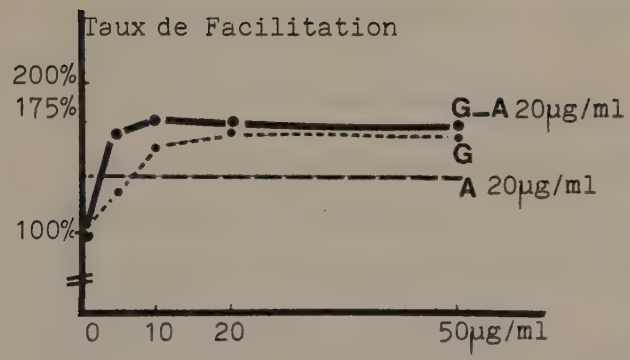
ASSOCIATION AMOGASTRINE-GLUCAGON



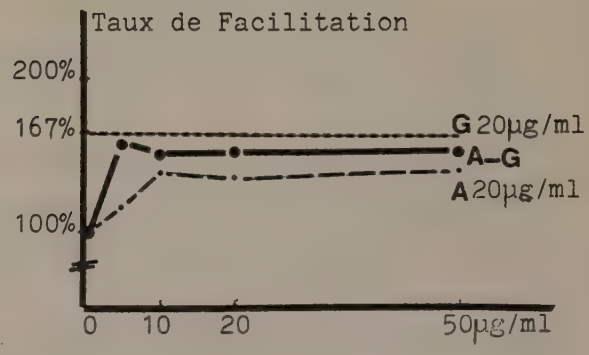

PLAQUE N° 49



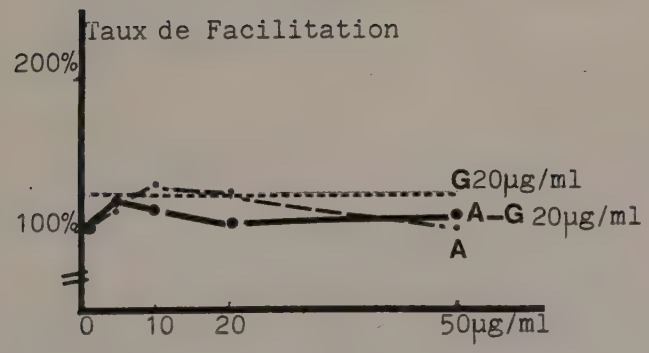

PLAQUE N° 50



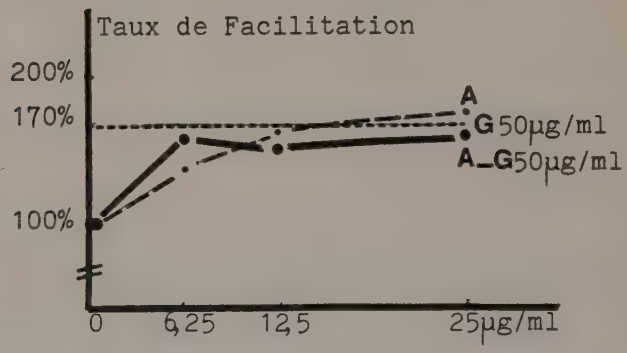

PLAQUE N° 66




PLAQUE N° 68




PLAQUE N° 70




PLAQUE N° 89

FIGURE XI

——— A_G ou ——— G_A
Association Amogastrine-Glucagon

---------- Glucagon
_ _ _ _ _ Amogastrine

- Le Glucagon à la concentration de 5 µg/ml, de 20 µg/ml et de 50 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine testée à 20 µg/ml avec $p < 0,01$.

. Plaque N° 68

- Le Glucagon à la concentration de 20 µg/ml améliore de façon significative l'effet trophique de l'Amogastrine (*Nihon.*) testée à 20 µg/ml avec $p < 0,01$.

. Plaques N° 70 et N° 89

Elles ne présentent aucune association synergique significative.

En résumé, l'ensemble des courbes X et XI et les résultats obtenus par le test U de Mann et Whitney permettent de démontrer :

- L'association synergique de l'Amogastrine - Glucagon dans leur effet trophique avec une amélioration des taux de facilitation lors de l'usage isolée d'une hormone pour des valeurs allant de 20 à 90 % selon les cas.

- Que cet effet synergique est davantage significatif lors de l'apport de Glucagon à l'Amogastrine et non l'inverse (même lors de l'utilisation de concentration optimale pour chacun des deux peptides, plaque N° 95 et N° 50).

Ceci suggère l'existence d'au moins deux récepteurs hormonaux à la surface cellulaire avec une éventuelle possibilité pour le Glucagon d'occuper des sites récepteurs de l'Amogastrine et non l'inverse.

A signaler que le Glucagon est de poids moléculaire 3 482 en concurrence avec l'Amogastrine de poids moléculaire 710. Lorsque l'on associe 6,25 µg/ml d'Amogastrine à 50 µg/ml de Glucagon, le rapport moléculaire est d'environ 1/1.

# - D I S C U S S I O N -

Nous avons montré l'action proliférative du Glucagon et de cinq analogues de la Gastrine sur la croissance cellulaire de deux lignées de cancer gastrique et colique chimio-induits chez le rat et cultivées dans un milieu sans serum.

. D'autre part, des substances comme l'épinéphrine, l'hydrocortisone, le β-oestradiol, la progesterone, la testosterone et le VIP étudiées sur la lignée BV9 dans les mêmes conditions, n'avaient montré aucun effet. KOBORI O., MARTIN F. (Travaux en publication).

. SVET-MOLDAVSKY G J. (12), lors de l'injection de pentagastrine à des souris porteuses de greffes tumorales diverses, a montré que seule la croissance d'adénocarcinomes coliques était facilitée.

Il semble alors que ces substances ont bien agi spécifiquement en fonction de leur origine digestive.

En dehors de l'effet secrétoire, l'effet trophique des hormones gastrointestinales sur la croissance de cellules épithéliales de l'estomac, de l'intestin et du pancréas a été mis en évidence *IN VITRO* au cours de ces dernières années JOHNSON J L. (2):
La Gastrine semble exercer une action trophique sur la muqueuse de l'estomac, de l'intestin grèle et du colon quant au Glucagon, cette action s'exerce au niveau de la muqueuse de l'estomac et du colon proximal.

. Au niveau de la lignée BV9, la Gastopsine (Amogastrine-*Nihon.)* à la concentration de 15 µg/ml augmente de 93 % l'incorporation de thymidine tritiée. KOBORI O., MARTIN F. (Travaux en publication). Cette incorporation de thymidine tritiée, témoin de la synthèse d'ADN, démontre bien que cet effet trophique est la conséquence d'une prolifération cellulaire sous l'effet d'Amogastrine.

Les conditions et les modèles expérimentaux utilisés doivent être pris en considération pour comprendre les differences de résultats obtenus selon les auteurs :

. MORLEY J S (9) obtient avec la Pentagastrine des résultats supérieurs comparés aux autres analogues de la Gastrine lors de l'étude de son effet secrétoire *IN VIVO* chez des rats anesthésiés.
Elle est également utilisée par d'autres auteurs : (5),(8) et (12) et devant nos difficultés de reproductibilité de notre test, lors de l'usage de la Pentagastrine, nous avons testé comparativement son homologue.
Il s'agit du N-t-Butyloxycarbonyl-Tryp-Meth-Asp-Phe-$NH_2$ qui est privé de "β-Alanyl" entre le groupe Butyloxycarbonyl et la séquence tetrapeptidique terminale.

Nous avons constaté que cet homologue était plus actif et en particulier au niveau des cellules DHD K12.

. Les concentrations des hormones qui ont permis une facilitation de la croissance des cellules DHD K12 et BV9 sont 10 à 50 fois supérieures à celles utilisées par d'autres auteurs et même $10^5$ fois supérieures aux doses physiologiques.

Pour une concentration de 0,5 µg/ml, la Pentagastrine possède une action promotrice sur la croissance épithéliale dans des prélèvements de muqueuse gastriques chez l'homme et chez le rat (8).

Pour une concentration identique, la Pentagastrine possède le même effet sur la croissance d'une culture de cellules duodénales d'un rat adulte (5).
Mais les cultures de ces deux auteurs LICHTENBERGER L.(5) et MILLER L R (8) furent placées dans un milieu complet pendant une semaine environ puis enrichies chaque jour de 0,5 µg/ml de Pentagastrine pendant trois mois.

MURAKAMI H. et MASUI H. (11) ont mis en évidence la croissance d'une lignée cellulaire de cancer colique humain dans un milieu sans serum en présence d'Insuline à un taux de 234 % à la concentration de 0,5 µg/ml et en présence de Glucagon à un taux de 157 % à la concentration de 0,2 µg/ml. Leurs cultures furent enrichies par des hormones pendant 21 jours.
Dans le cadre de nos expériences, le contact cellules-hormones n'a duré que 72 heures.

A l'inverse de MURAKAMI H. et MASUI H. (11), l'Insuline que nous avons testée sur nos deux lignées aux concentrations de $2,5 \times 10^{-6}$ à 50 µg/ml s'est montrée faiblement inhibitrice.

Le facteur temps, les lignées cellulaires qui sont différentes, mais en particulier la provenance et la pureté des substances testées peuvent en partie expliquer les différences de résultats.

. A cet effet, nous avons testé deux analogues homologues de la Gastrine en provenance de deux Laboratoires différents :
La Gastopsine (Amogastrine) *Nihon Kayaku Co.* et l'Amogastrine *Sigma* ont été testées comparativement au niveau des deux lignées cellulaires.
Nous esperions une activité superposable de ces deux peptides mais nos résultats préliminaires nous ont montré que l'Amogastrine *Sigma* était plus active et en particulier au niveau de la lignée DHD K12.

Concernant la Gastrine, il était très intéressant d'étudier le site actif de cette hormones au moyen de ces analogues :
. La L-Phe-$NH_2$ et la L-Asp-L-Phe-$NH_2$ n'ont présenté aucune facilitation de la croissance cellulaire.
. Le N-t-Butyloxycarbonyl-B-Ala-L-Tryp-L-Meth-*B-Benzyl*-L-Asp-L-Phe-$NH_2$ qui est la Pentagastrine bloquée, testée sur la lignée BV9, n'avait aucune activité. KOBORI O., MARTIN F. (Travaux en publication).
Mais la séquence non stabilisée qui est le L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$ a présenté une activité significative sur la croissance cellulaire au niveau des deux lignées et en particulier sur les DHD K12 avec un taux de 268 % à 12,5 µg/ml dans le meilleur cas.

Ceci est bien en accord avec les travaux de MORLEY J S. (9) qui a montré que l'activité hormonale de la Gastrine résidait dans la présence, selon cet ordre, de cette séquence tetrapeptidique terminale.

Enfin il a été établi que la Gastrine et d'autres peptides comme le CCK-PZ et la Céruleine appartiennent à la famille de la GASTRINE (10) alors que la Glucagon appartient à la famille de la SECRETINE (1).

. Compte tenu de l'effet trophique obtenu avec le Glucagon d'une part et les analogues de la Gastrine d'autre part, nous avons supposer l'existence de 2 types de récepteurs hormonaux à la surface cellulaire.

. Dans l'éventualité de l'existence de 2 types de récepteurs hormonaux différents à la surface cellulaire, il était

important de savoir si l'association de ces deux produits aurait un effet synergiques.

Cet effet synergique a été obtenu de façon modérée mais significative pour des concentrations optimales de facilitation.

Mais nous avons constaté que le Glucagon améliorait le rendement de l'Amogastrine, qu'il s'agisse d'Amogastrine *Nihon* ou d'Amogastrine *Sigma*, que lors de la situation inverse.

Il reste donc à savoir si le Glucagon a la possibilité d'occuper certains sites récepteurs de l'Amogastrine.

Il est donc souhaitable de renouveler ces expériences et envisager de nouvelles associations.

# C O N C L U S I O N S

L'effet trophique d'hormones et de peptides en contact avec des cellules cancéreuses gastriques et coliques de rat cultivées dans un milieu sans serum a été étudié quantitativement par une méthode colorimétrique indirecte.

Dans les deux lignées une augmentation significative du nombre des cellules a été obtenue. Elle est de l'ordre de 123 à 408 % selon les cas par rapport au nombre de cellules contrôles cultivées sans serum et sans hormone.

. Toutes les substances actives testées appartiennent aux deux grandes familles des hormones gastrointestinales. Il s'agit du Glucagon appartenant à la famille de la SECRETINE et de cinq peptides analogues de la GASTRINE.

. Il est également démontré que la séquence tetrapeptidique terminale de la GASTRINE qui est le L-Tryp-L-Meth-L-Asp-L-Phe-$NH_2$ possède la partie active de cette hormone alors que la L-Phe-$NH_2$ et la L-Asp-L-Phe-$NH_2$ ne présentent aucune activité sur la croissance cellulaire.

. L'Insuline s'est présentée comme un inhibiteur de la croissance cellulaire dans les deux lignées.

Enfin l'association d'une hormone de chaque famille (Glucagon-Amogastrine) nous a permis d'obtenir un effet trophique synergique significatif qui, dans le meilleur des cas, donne un taux de facilitation de 300 % alors que l'Amogastrine, testée seule, donne un taux de 210 %.

. Ceci nous permet de suggérer l'existence d'au moins deux types de récepteurs hormonaux à la surface cellulaire.

. On a pu constater que cet effet synergique était plus important lors de l'adjonction de Glucagon à l'Amogastrine que dans la situation inverse.
Ceci laisse supposer que le Glucagon pourrait occuper certains sites récepteurs de l'Amogastrine.

Cette étude nous a permis une approche des mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire des cancers digestifs.
Elle pourrait susciter la recherche de nouvelles modalités thérapeutiques utilisant des substances bloquantes de la croissance cellulaire.

Le Président de Thèse :

Vu et permis d'imprimer

Dijon, le 22 . 10.81

Le Doyen,

# B I B L I O G R A P H I E

1 - BODANSKY M., KLAUSNER Y S., SAID S I.
Biological activities of synthetic peptides corresponding to fragments of and to the entire sequence of the vasoactive intestinal peptide.
Proc Natl Acad Sci. USA, 70: 382-384, 1973.

2 - JOHNSON L R.
Effect of gastrointestinal hormones on growth of gastrointestinal tissues. Dans : Gastrointestinal Hormones (Ed.George B. Jersy Glass.)
Raven Press New York, 507-527, 1980.

3 - KOBORI O., MARTIN F., MARTIN M., TURC C.
Establishment of a cell culture line from a transplantable rat stomach cancer by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Cancer Res., 39: 5141-5146, 1979.

4 - LAGNEAU A., MARTIN M., MARTIN F., MICHEL M F.
Effets cytotoxiques des macrophages péritonéaux sur un carcinome intestinal de rat. Mise au point d'un nouveau test de cytotoxicité.
C R Soc. Biol., 177: 90-93, 1977.

5 - LICHTENBERGER L., MILLER L R., ERWIN D N., JOHNSON L R.
Effect of pentagastrin on adult rat duodenal cells in culture.
Gastroenterology, 65: 242-251, 1973.

6 - MARGUERITE A.
Incidence et survie des cancers du tube digestif dans le Département de la Côte D'Or. Bilan de 5 années d'enregistrement 1976-1980.
Travail du Registre des Tumeurs de la Côte d'Or.
Thèse Med., Dijon, 1981.

7 - MARTIN M.S., MARTIN F., JUSTRABO E., TURC C., LAGNEAU A.
Lignées transplantables et cultures cellulaires obtenues à partir de carcinomes intestinaux chimio-induits chez le rat.
Biologie et Gastroentérologie, 9: 185-192, 1976.

8 - MILLER L R., JACOBSON E D., JOHNSON L R.
Effect of pentagastrin on gastric mucosal cells grown in tissue culture
Gastroenterology, 64 : 254-267, 1973.

9 - MORLEY J S.
Syntheses of human gastrin and the biological properties of analogues.
Peptides - North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 226-234, 1967.

10 - MORLEY J S.
Gastrin and related peptides.
Struture-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones.
(Ed. Margoylies M. Greenwood F C.)
Excerpta Medica Amsterdam, 11-17, 1971.

11 - MURAKAMI H., MASUI H.
Hormonal control of Human colon carcinoma cell growth in serum-free medium.
Proc Natl Acad Sci. USA, 77: 3464-3468, 1980.

12 - SVET-MOLDAVSKY G J.
Dependence of gastro-intestinal tumors on gastro-intestinal hormones : Pentagastrin stimulates growth of transplanted colon adenocarcinoma in mice.
Biomedicine, 33: 259-261, 1980.

# TABLE DES MATIERES


| | Pages |
|---|---|
| INTRODUCTION | 1 |
| MATERIEL ET METHODES | 2 |
| . Les cellules utilisées | 2 |
| . Mode de culture | 3 |
| . Le comptage et implantation des cellules | 5 |
| . Les hormones et les peptides testés | 6 |
| . Description du test | 7 |
| . Arret du test | 8 |
| . Interpretation du test | 9 |
| PRESENTATION DES RESULTATS | 11 |
| . Analyse des résultats de chaque produit testé | 11 |
| . Les hormones en association | 45 |
| DICUSSION | 50 |
| CONCLUSIONS | 54 |
| BIBLIOGRAPHIE | 56 |


--==oOo==--